

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Roman Janusz Nowicki

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych



**Interdyscyplinarne badania eksperymentalne
oceniające możliwości zastosowania nanocząstek
srebra jako miejscowego preparatu
przeciwbakteryjnego**



Dorota Mehrholz

Promotor: dr hab. n. med. Wioletta Barańska-Rybak, prof. nadzw. GUMed

GDAŃSK 2019

Badania finansowane z OPUS 2013/11/B/ST5/02199z

Serdeczne podziękowania

Promotorowi: **Pani dr hab.n.med Wioletcie Barańskiej Rybak, prof. nadzw. GUMed** za to, że od IV roku studiów medycznych jest dla mnie autorytetem jako człowiek, lekarz i naukowiec. Dziękuję za ogromne wsparcie, cenne rady, ciągle motywowanie oraz przekazywaną wiedzę.

Kierownikowi Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie **Panu Prof. dr. hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu** za przekazanie wiedzy dotyczącej nanocząstek, udostępnienie wyników swoich badań, możliwość pracy w laboratoriach Instytutu, sfinansowanie przeprowadzonych badań oraz za cierpliwość, gościnność i długie godziny wspólnych rozmów

Kierownikowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed: **Panu Prof. dr hab. n. med. Romanowi Nowickiemu** za umożliwienie przeprowadzenia badań i zapewnienie atmosfery sprzyjającej realizacji doktoratu

Kierownikowi Zakładu Chemii Nieorganicznej GUMed **Panu Prof. dr. hab. n. farm. Wojciechowi Kamyszowi** za możliwość wykonania badań bakteriologicznych.

Kierownikowi Zakładu Immunologii GUMed **Panu dr hab. n. med. Michałowi Pikule**, za możliwość wykonania badań cytotoksyczności.

inż. Patrycji Wardaszce, mgr Maćkowi Jaśkiewiczowi i dr.n.med Milenie Deptule za pomoc w wykonaniu badań i cenną praktyczną pomoc

Rodzicom za otrzymane wykształcenie i wychowanie

Partnerowi za wsparcie i wyrozumiałość

oraz wszystkim którzy przyczynili się do powstaniu tej pracy

Spis treści

Spis treści.....	2
Wykaz skrótów	4
1. Wstęp.....	5
1.1 <i>Charakterystyka ogólna NPs</i>	6
1.1.1 Definicja NPs	6
1.1.2 Sposoby syntezy NPs metali.....	6
1.1.3 Rola substancji opłaszczającej w syntezie NPs	8
1.1.4 Sposoby oczyszczania NPs	9
1.1.5 Metody fizykochemiczne używane do charakterystyki NPs	10
1.1.6 Metody badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych NPs.....	12
1.1.7 Metody oceny cytotoksyczności AgNPs	14
1.2 <i>Rola AgNPs jako substancji przeciwdrobnoustrojowej.....</i>	16
1.3 <i>Rola szczepów gronkowca złocistego w chorobach skóry.....</i>	18
2. Cele pracy	19
3. Materiały i metody.....	20
3.1 <i>Materiały.....</i>	20
3.2 <i>Metody</i>	20
3.2.1 Synteza AgNPs	20
3.2.2 Oczyszczanie AgNPs	21
3.2.3 Badania stabilności kinetycznej AgNPs	21
3.2.4 Charakterystyka fizykochemiczna AgNPs	22
3.2.5 Badanie aktywności przeciwgronkowcowej AgNPs	24
3.2.6 Badanie cytotoksyczności AgNPs na ludzkie keratynocyty	26
3.2.7 Analiza statystyczna wyników.....	26
4. Wyniki.....	27

4.1	<i>Synteza NPs</i>	27
4.1.1	Synteza AgNPs opłaszczanych PVP.....	28
4.1.2	Synteza AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi.....	29
4.1.3	Synteza AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego	31
4.2	<i>Ocena stabilności kinetycznej AgNPs oraz siły działania przeciwgronkowcowego AgNPs w czasie</i>	32
4.2.1	Ocena stabilności kinetycznej AgNPs	32
4.2.2	Ocena siły działania przeciwgronkowcowego w czasie (trwałość mikrobiologiczna).....	37
4.3	<i>Wpływ oczyszczania za pomocą dializy na aktywność przeciwdrobnoustrojową NPs</i>	44
4.3.1	AgNPs opłaszczane PVP	45
4.3.2	AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi	46
4.4	<i>Badania nad wpływem substancji opłaszczającej na morfologię i działanie przeciwgronkowcowe AgNPs</i>	48
4.4.1	Ocena działania przeciwgronkowcowego AgNPs w zależności od rodzaju stabilizatora	48
4.4.2	Badania fizykochemiczne	57
4.5	<i>Ocena cytotoksyczności AgNPs</i>	68
5.	Omówienie i dyskusja	69
6.	Wnioski	79
7.	Spis tabel	81
8.	Spis rycin	83
9.	Spis wykresów	84
10.	Streszczenie	86
11.	Summary	88
12.	Piśmiennictwo	89

Wykaz skrótów

AgNPs

(ang. *silver nanoparticles*) – Nanocząstki srebra,

AgNPsB

AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego i alkoholi długołańcuchowych

AgNPsC

AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi

AgNPsPVP

AgNPs opłaszczane poliwinylpirrolidonem

B10, B12 itd.

AgNPs opłaszczone estrem kwasu bursztynowego i alkoholu o liczbie atomów węgla w cząsteczce odpowiadającej liczbie znajdującej się po literze B

C10, C11 itd.

AgNPs opłaszczone długołańcuchowym kwasem karboksylowym o liczbie węgla odpowiadającej liczbie znajdującej się po literze C

IC50

Stężenie substancji hamujące wzrost 50% komórek

MIC

(ang. *minimum inhibitory concentration*) – Minimalne stężenie hamujące,

NPs

(ang. *nanoparticles*) - Nanocząstki,

PVP

(ang. *polivinylpirrolidone*) - Poliwinylpirolidon

PVP 3,5, 25 itd.

AgNPs opłaszczone PVP o masie cząsteczkowej polimeru np. 3,5 kDa, 25 kDa i analogicznie

1. Wstęp

Infekcje bakteryjne są ważnym problemem współczesnej medycyny z uwagi na rosnącą antybiotykooporność szczepów¹. Zmniejszenie oporności bakterii na antybiotyki stało się celem zdrowotnym Światowej Organizacji Zdrowia. Opracowano listę szczepów z największym potencjałem do nabywania oporności. Pośród nich znalazły się szczepy gronkowca złocistego (łac. *Staphylococcus aureus*) - *S. aureus*. Szczególnie niebezpieczne są szczepy metycylinooporne – MRSA (ang. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) i wankomycynooporne – VRSA (ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*). *S. aureus* jest czynnikiem etiologicznym wielu infekcji szpitalnych i poza szpitalnych, najczęściej wywołuje infekcje skóry i tkanki podskórnej. Ponadto *S. aureus* kolonizuje rany przewlekłe i często wywołuje infekcje w ranie².

Jednym ze sposobów zmniejszenia antybiotykooporności bakterii jest ograniczenie użycia antybiotyków. W przypadku infekcji skóry alternatywą może być użycie miejscowych środków odkażających takich jak: podchloryny, powidon jodowy, oktenidyna czy PHMB (poliheksametylen biguanidu). Opatrunki zawierające srebro są wykorzystywane w leczeniu trudno gojących się ran, jednakże odnotowuje się również przypadki oporności szczepów na związki srebra. Dlatego w dalszym ciągu intensywnie poszukiwane są nowe metody leczenia zakażeń.

Potencjalnymi substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym są nanocząstki metali, a szczególnie nanocząstki srebra (AgNPs). Przeciwbakteryjne właściwości AgNPs, są niezależne od ich chemicznej budowy i wynikają z mikronizacji srebra do wielkości 1×10^{-9} m. Nanocząstki (NPs) skutecznie działają zarówno wobec bakterii Gram ujemnych jak i Gram dodatnich³. Co więcej wykazano, że NPs potrafią przeniknąć do struktury biofilmu⁴. Poza tym AgNPs wykazują działanie przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe oraz przeciwzapalne⁵. Unikatowe właściwości AgNPs są przedmiotem wielu badań naukowych, a preparaty zawierające te nanomolekuły chętnie wprowadzane są na rynek⁶⁻⁸.

Przeciwbakteryjne właściwości NPs metali zostały dobrze udokumentowane. Udowodniono, iż kształt i wielkość AgNPs mają wpływ na siłę działania przeciwbakteryjnego^{9,10}. Znacznie mniej wiadomo jest na temat tego jaki wpływ na działanie biologiczne AgNPs ma rodzaj substancji opłaszczającej. Niewiele jest również badań w których w sposób systematyczny bada się wpływ różnych czynników na tworzenie NPs, ich trwałość czy efektywność procesu syntezy.

1.1 Charakterystyka ogólna NPs

1.1.1 Definicja NPs

Zgodnie z definicją podaną przez NICNAS (ang. *The National Industrial Chemicals Notifications and Assessment Scheme*) NPs to substancja, której przynajmniej jeden z wymiarów mieści się w przedziale od 1 do 100 nm oraz której właściwości są odmienne od tych które ta substancja wykazuje w makro-skali¹¹.

NPs mogą być substancjami organicznymi takimi jak: białka, kwasy nukleinowe, wirusy lub nieorganicznymi, wśród których dominują metale. NPs, będące pochodnymi tego samego metalu, mogą mieć różnorodny kształt, rozmiar, ładunek i hydrofobowość. Ponadto NPs mogą być stabilizowane różnymi molekułami, co wpływa na ich działanie i właściwości fizykochemiczne.

NPs charakteryzują się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi niż substancje makroskopowe z których powstały. Dzieje się tak przez specyficzne rozmieszczenie atomów do którego dochodzi kiedy substancja osiąga rozmiary mniejsze niż 1×10^{-7} m. Wynika to ze zwiększenia gęstości atomów na powierzchni NPs o zmniejszenia gęstości w centrum. Ponadto NPs cechują swoiste właściwości optyczne dzięki powierzchniowemu rezonansowi plazmonowemu. Elektrony walencyjne nanocząstek metalicznych są słabo związane z jądrem atomowym i mają zdolność do swobodnego przemieszczania się pomiędzy powłokami. Skupisko elektronów walencyjnych nazywane jest plazmonem. Jeżeli na NPs oddziałuje światło, czyli fala elektromagnetyczna o określonej długości, której częstotliwość jest taka sama jak drgania wewnętrzne plazmonu, wówczas występuje rezonans. Makroskopowo jest to widoczne jako kolor substancji, co umożliwia badanie NPs przy pomocy metod spektrofotometrycznych. Im mniejsza cząstka tym rezonans większy, a co za tym idzie absorbcja fal o mniejszej długości. NPs absorbują fale świetlne długości ok. 400 nm^{12,13}.

1.1.2 Sposoby syntezy NPs metali

AgNPs można otrzymywać dwiema drogami. Pierwsza polega na zmniejszaniu do rozmiarów nano materiału makroskopowego i nazywana jest *top down*. Druga droga polega na powiększaniu jonów, cząsteczek lub atomów i nazywana jest *bottom up*¹⁴. Istnieją trzy główne metody syntezy NPs: fizyczna, chemiczna i biologiczna.

1.1.2.1 Metoda fizyczna

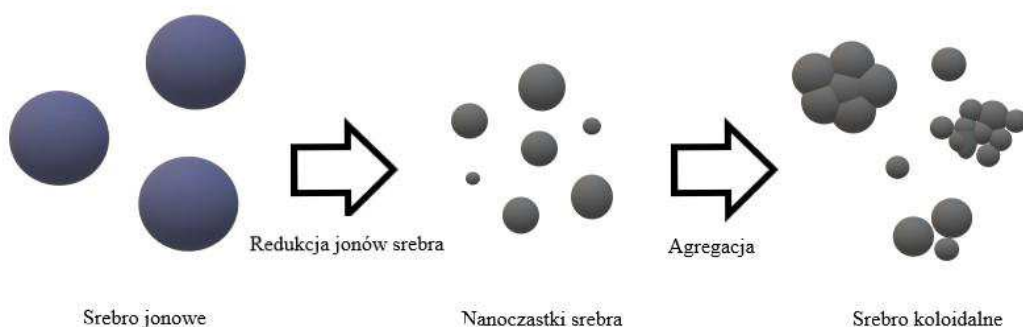
Metody fizyczne opierają się głównie na koncepcji *top down*. NPs metali można tworzyć z metalu w każdym stanie skupienia. Przedstawiono dwa przykładowe sposoby syntezy fizycznej: ewaporację-kondensację oraz obróbkę elektroiskrową. Ewaporacja-kondensacja polega na doprowadzeniu metalu do temperatury wrzenia. Następnie pary metalu zawieszane są w gazie nośnym i w trakcie obniżania temperatury mieszaniny tworzą się NPs. Kolejny sposób to obróbka elektroiskrowa, która polega na wyładowaniu łuku elektrycznego pomiędzy dwiema elektrodami srebrnymi zanurzonymi w cieczy.

Niewątpliwą zaletą metod fizycznych jest mała dyspersja rozmiaru otrzymanych NPs oraz wysoka czystość roztworu po syntezie. Metody fizyczne są jednak kosztowne i wymagają specjalistycznego sprzętu¹⁵.

1.1.2.2 Metoda chemiczna

Synteza chemiczna NPs metali jest bardzo prosta i polega na wykonaniu reakcji redukcji jonów metalu. Substratem do otrzymania AgNPs jest najczęściej azotan srebra (AgNO_3). Substancjami redukującymi mogą być: trietyloaminy, formaldehyd, etanol, cytrynianu sodu, przy czym najczęściej wykorzystywany jest borowodorek sodu. W wyniku redukcji powstają NPs metalu, które w procesie agregacji naturalnie tworzą srebro koloidalne, jak to przedstawiono na ryc. 1. Żeby spowolnić proces agregacji konieczne jest użycie stabilizatora, czyli substancji opłaszczającej.

Synteza NPs jest szybka, prosta i nie wymaga specjalistycznego sprzętu. Wadą jest obecność zanieczyszczeń w mieszaninie poreakcyjnej.



Ryc. 1. Schemat powstawania NPs metali poprzez redukcję jonów srebra oraz proces agregacji NPs doprowadzający do powstania srebra koloidalnego.

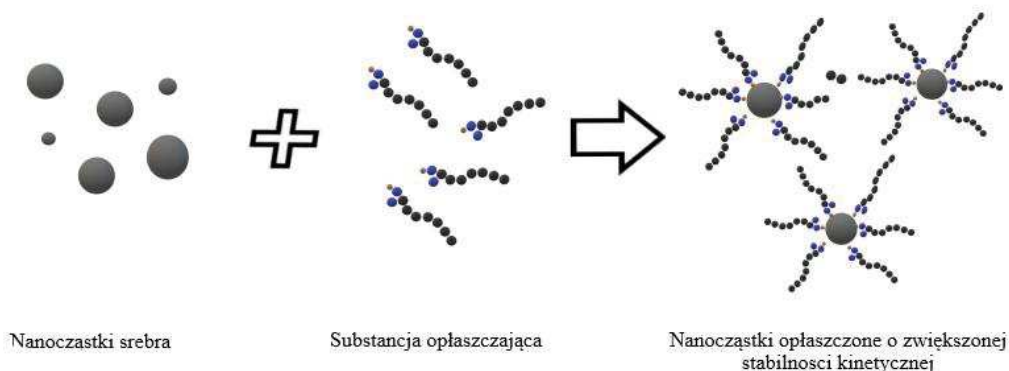
1.1.2.3 Metoda biologiczna

Jest to również rodzaj syntezy chemicznej, gdyż do tworzenia AgNPs wykorzystywane są jony metalu, natomiast reduktorem są organizmy żywe, najczęściej bakterie lub grzyby. Uważa się, że jest to metoda ekologiczna określana mianem zielonej syntezy (ang. *green synthesis*). Do zawiesiny bakteryjnej dodawane są jony srebra i zachodzi proces redukcji. Następnie bakterie poddawane są szokowi osmotycznemu, co doprowadza pęknięcia błon komórkowych bakterii i uwolnienia NPs. Uwolnione NPs są stabilizowane przez cukry, białka i tłuszcze budujące komórkę bakteryjną¹⁵.

Zanieczyszczenie mieszaniny jest duże, a określenie czynnika stabilizującego jest trudne, gdyż większość związków chemicznych budujących komórkę może być czynnikiem stabilizującym.

1.1.3 Rola substancji opłaszczającej w syntezie NPs

NPs są strukturami o małej stabilności chemicznej i szybko ulegają agregacji, powracając do korzystniejszych energetycznie rozmiarów makroskopowych. Zagregowane NPs tracą unikalne dla struktur nano cechy. Zastosowanie substancji opłaszczających NPs spowalnia proces agregacji jak przedstawiono na ryc. 2^{16,17}.



Ryc. 2. Działanie substancji opłaszczającej jako czynnika spowalniającego proces agregacji.

Czynniki opłaszczające, czyli stabilizatory można podzielić na jonowe i niejonowe. Mechanizm działania stabilizatorów niejonowych polega na wykorzystaniu sił odpychających. Dochodzi do adsorpcji stabilizatora w warstwie międzyfazowej pomiędzy powierzchnią NPs, a roztworem dzięki czemu siły przyciągania pomiędzy nanocząstkami są równoważone przez siły odpychające stabilizatora. Do takich stabilizatorów należą polimery np: PVP (poliwinylpirolidon). Stabilizatory jonowe działają z wykorzystaniem oddziaływań sił elektrostatycznych. AgNPs obdarzone

ładunkiem dodatnim oddziałują z ujemnie naładowanymi cząstkami stabilizatora. Przykładem jonowych stabilizatorów są: dodecylosiarczan sodu czy też kwasy karboksylowe. W przypadku kiedy, jako stabilizator zostanie wykorzystany długołańcuchowy kwas karboksylowy, ujemnie naładowana część hydrofilowa kwasu oddziałuje z nanocząstką srebra, a hydrofobowe łańcuchy węglowe ustawiają się w stronę roztworu jak to przedstawiono na ryc. 2.

Warto zwrócić uwagę, iż testy mikrobiologiczne i testy cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych trwają kilka dni, więc NPs mające służyć jako obiekt do badań biologicznych powinny być stabilne przez przynajmniej tydzień. Nie istnieją badania nad wpływem użycia jako stabilizatora dla AgNPs nasyconych kwasów karboksylowych na stabilność, trwałość i działanie przeciwdrobnoustrojowe NPs.

1.1.4 Sposoby oczyszczania NPs

W zależności od metody syntezy NPs w mieszaninie poreakcyjnej mogą znajdować się różne zanieczyszczenia. Reakcje chemiczne nie przebiegają ze 100% wydajnością, więc w roztworze pozostają różne formy srebra (jony srebra, srebro koloidalne), nadmiar reduktora i substancji opłaszczającej¹⁸. Ponadto w mieszaninie mogą się znaleźć produkty uboczne reakcji syntezy np. jony sodu jony azotanowe. Zaletą syntezy chemicznej jest to, że dokładnie znane są substraty reakcji, i w prosty sposób można przewidzieć rodzaj zanieczyszczeń. Natomiast w przypadku syntezy biologicznej jest to właściwie niemożliwe, gdyż nie jest wiadome jakie składniki komórki bakteryjnej budują NPs, a jakie stanowią zanieczyszczenie.

Proces oczyszczania jest ważny szczególnie podczas syntezy NPs, które mają być obiektem do badań biologicznych, bowiem zanieczyszczenia mieszaniny mogą wykazywać działanie biologiczne, co może doprowadzić do uzyskania nieobiektywnych wyników⁷. Jest niewiele prac, w których zwrócono uwagę na konieczność oczyszczania roztworu NPs. Opisy oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej zawarte są głównie w publikacjach dotyczących chemicznej syntezy NPs. Najprostszą metodą oczyszczania mieszaniny jest wirowanie¹⁹. Opisuje się również oczyszczanie roztworów przy pomocy odparowywania rozpuszczalnika i następnie ponownego rozpuszczania nanocząstek w czystym rozpuszczalniku²⁰. Bardzo efektywną, przy czym kosztocłonna i pracochłonną metodą jest oczyszczanie NPs przy pomocy elektroforezy. Wydaje się, że równie efektywnym sposobem na pozbycie się zanieczyszczeń z mieszaniny

poreakcyjnej jest dializa, która jest metodą prostą i tanią, ale rzadko wykorzystywaną w przypadku NPs²¹

1.1.5 Metody fizykochemiczne używane do charakterystyki NPs

Metody fizykochemiczne, które są używane do badania NPs pozwalają precyzyjnie opisać kształt, wielkość, ładunek oraz jakość i rozkład czynnika opłaszczającego na NPs. Opisano wybrane metody fizykochemiczne, którymi posłużono się w badaniach własnych.

1.1.5.1 Spektrometria

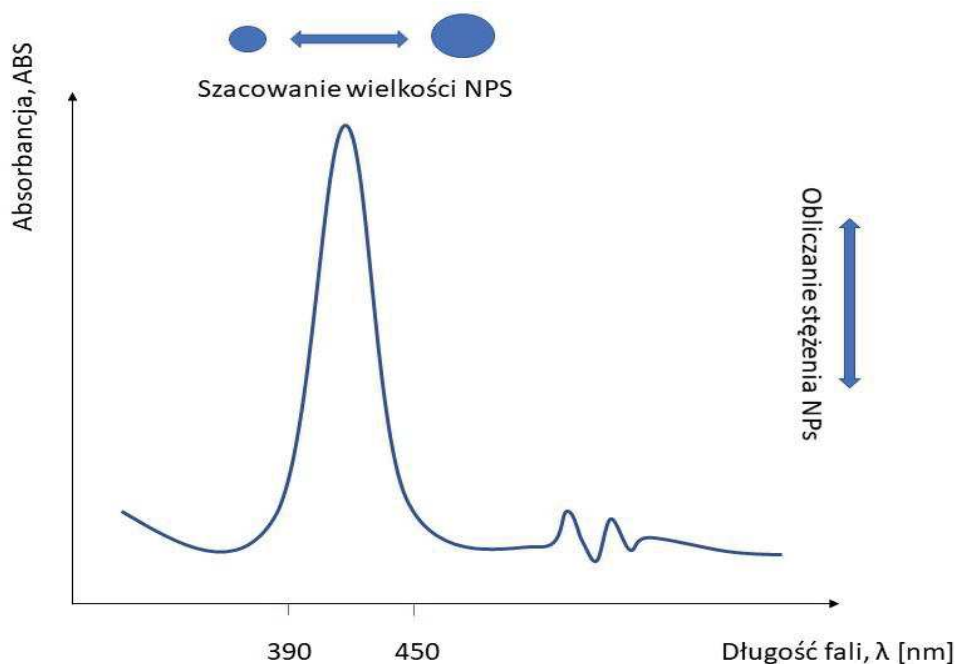
Spektrofotometria polega na pomiarze ilości światła odbijanego lub pochłanianego przez roztwór. Jest to popularna metoda pozwalająca na precyzyjne obliczenie stężenia roztworów poprzez pomiar absorbancji i z wykorzystaniem prawa Labmbera-Beera. Roztwory AgNPs, poddają się działaniu tego prawa, gdyż wykazują powierzchniowy rezonans plazmonowy dzięki czemu możliwe jest obliczanie stężeń roztworów²².

1.1.5.1.1 Spektrometria UV-vis

To narzędzie w którym wykorzystuje się światło widzialne oraz ultrafioletowe w zakresie (200 nm do 1100 nm). W spektrofotometrze mierzona jest ilość promieniowania elektromagnetycznego zaabsorbowanego przez roztwór NPs w określonej długości fali. Na tej podstawie wykreślane są krzywe absorbancji²³. Długość fali jest proporcjonalna do wielkości AgNPs, a absorbancja do stężenia. Na podstawie krzywych absorbancji możliwe jest więc szacowanie wielkości i stężenia badanego roztworu NPs²⁴. W tabeli 1 przedstawiono szacunkowe rozmiary NPs w zależności od długości fali, natomiast na wykresie 1 typową dla roztworu AgNPs krzywą absorbancji.

Rozmiar NPs [nm]	λ_{\max} [nm]
10 - 14	395 – 405
35 - 50	420
60 - 80	438

Tabela 1. Szacunkowe rozmiary NPs odpowiadające poszczególnym długościom fali ²¹.



Wykres 1. Krzywa absorbancji typowa dla NPs. Na przedstawionej krzywej największe stężenie badanej substancji odpowiada długości fali świetlnej charakterystycznej dla wielkości nano (ok. 400 nm). Pozostałe wzniesienia na krzywej odpowiadają obecności zanieczyszczeń roztworze.

1.1.5.1.2 Spektroskopia w podczerwieni, IR

Jest to rodzaj spektrofotometrii wykorzystujący promieniowanie podczerwone. Wynikiem pomiaru IR jest krzywa zależności transmitancji od liczby falowej. Dzięki analizie krzywej IR jest możliwe ustalenie jakie grupy funkcyjne występują w badanym organicznym związku chemicznym. Absorbancja promieniowania podczerwonego przez grupę funkcyjną związku chemicznego zachodzi w ściśle określonej i charakterystycznej dla tej grupy częstotliwości. Na podstawie bazy danych z częstotliwościami określonych pasm możliwe jest precyzyjne określenie budowy związku chemicznego. Jest to więc popularna technika wykorzystywana w chemii analitycznej. Przy użyciu metody IR nie jest możliwa analiza związków nieorganicznych, co w przypadku NPs umożliwia ocenę czynnika opłaszczającego²³. Rdzeń AgNPs będący metalem pozostaje dla metody niewidoczny.

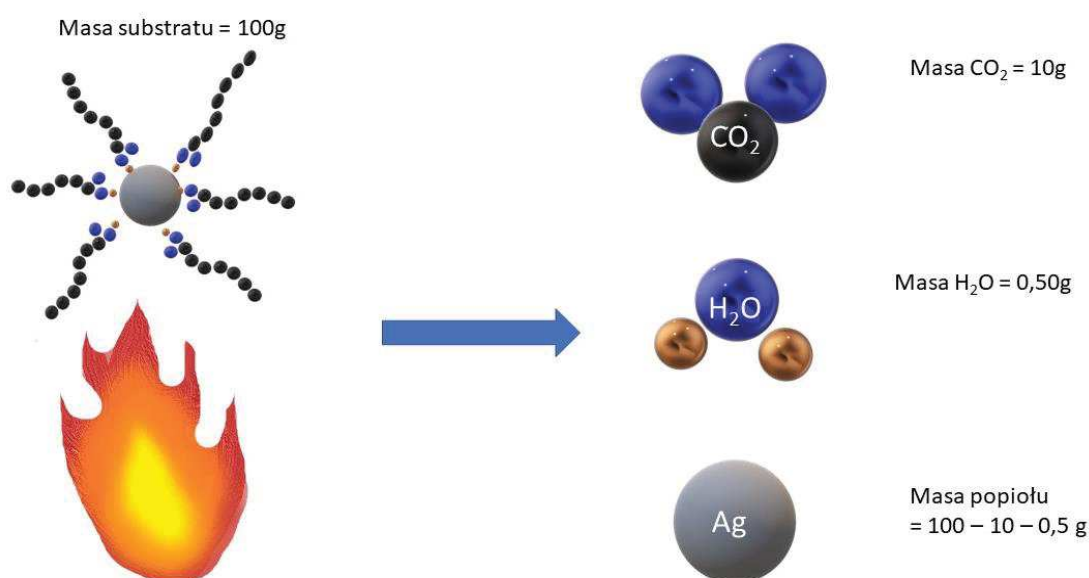
1.1.5.2 Dynamiczne rozpraszanie światła, DLS

Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, Dynamic Light Scattering) to metoda stosowana w chemii analitycznej do określania rozmiarów oraz dyspersyjności cząstek.

Przy użyciu wiązki laserowej mierzony jest stopień rozproszenia światła przechodzącego przez ośrodek. Rozproszenie jest tym bardziej jednorodne im szybsze ruchy Browna poruszających się cząstek, z kolei im większa średnica badanych cząstek tym wolniejsze są ich ruchy²³. Dzięki tej metodzie możliwe jest określenie całkowitej średnicy AgNPs.

1.1.5.3 Analiza elementarna

Analiza elementarna to technika umożliwiająca zbadanie składu pierwiastkowego substancji. Polega ona na spalaniu otrzymanego związku chemicznego do węgla i tlenków różnych pierwiastków. Następnie przy pomocy chromatografu gazowego analizowania składu i masy poszczególnych produktów reakcji spalania. W tej metodzie standardowo wykrywa się związki zawierające węgiel, wodór, azot. Jeżeli znane są masy cząsteczkowe składników badanej substancji to w wyniku zastosowania analizy elementarnej znany będzie dokładny wzór sumaryczny badanej substancji²⁵. Na ryc. 3 przedstawiono proces spalania AgNPs oraz przykładowe wyniki analizy elementarnej.



Ryc. 3. Przykład procesu spalania analitycznego i przeprowadzenia analizy elementarnej. W wyniku procesu spalania otrzymuje się tlenki spalonych substancji, detektory gazowe wykrywają związki wodoru, węgla, azotu i fosforu. Po wykonaniu odpowiednich obliczeń chemicznych możliwe jest ustalenie wzoru sumarycznego badanego substratu. Srebro budujące AgNPs nie ulega spalaniu więc obliczając masę popiołu znana będzie liczba atomów srebra.

1.1.6 Metody badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych NPs

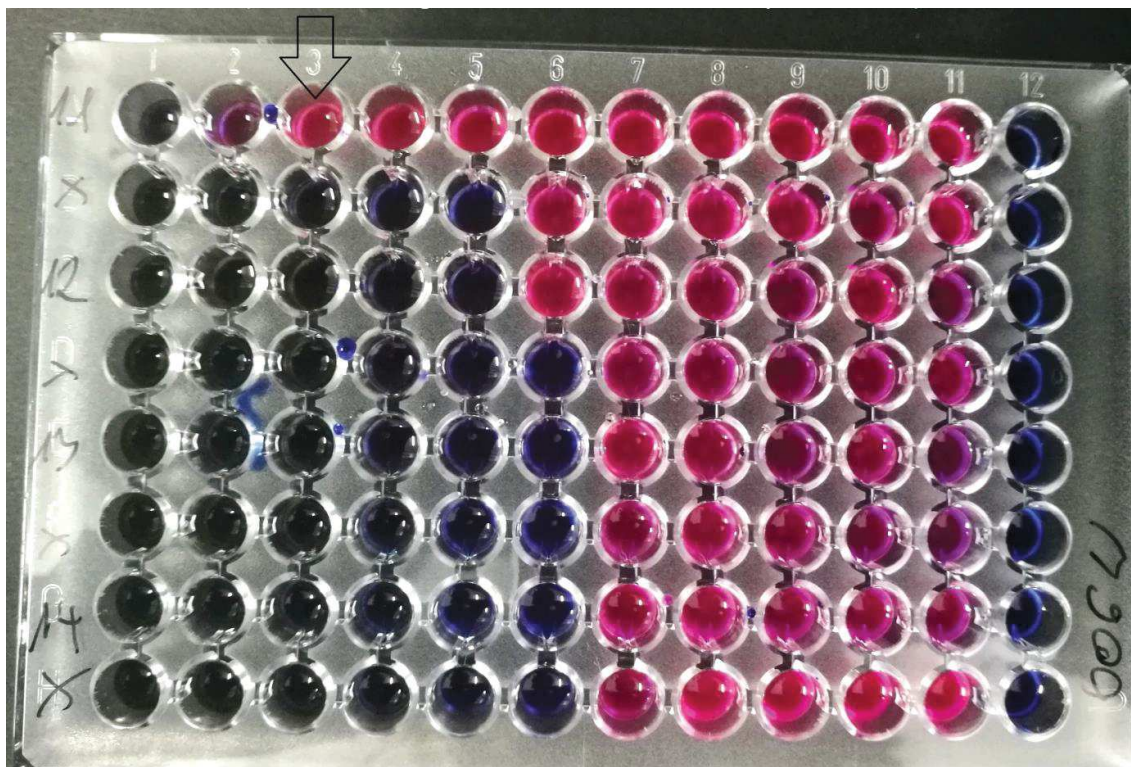
Metodami określającymi działanie przeciwdrobnoustrojowe substancji chemicznych są: metoda krążkowo-dyfuzyjna, metoda dyfuzji z paska z gradientem stężeń (np. E-test) oraz metoda seryjnych rozcieńczeń w agarze i w bulionie. Wszystkie,

oprócz metody krążkowo-dyfuzyjnej, pozwalają określić najmniejsze stężenie hamujące wzrost bakterii – (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) (MIC). Wymienione metody zostały wystandaryzowane przez Amerykański Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych – (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI) oraz Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości – (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST). Dla każdego antybiotyku stosowanego w terapii oraz dla każdego gatunku lub grupy drobnoustrojów określona została średnica stref zahamowania wzrostu (w milimetrach) oraz MIC w metodzie seryjnych rozcieńczeń (w mg/L), determinujące wrażliwość bądź niewrażliwość na badany lek. Wartości te są spisane i wydane w postaci tabelarycznej. W ten sposób oznaczana jest wrażliwość bakterii na antybiotyki, umożliwiającą stworzenie antybiogramów.

Metoda krążkowo-dyfuzyjna polega na zastosowaniu krążków bibułowych zawierających określone stężenia substancji przeciwdrobnoustrojowych, które dyfundują do stałego podłoża mikrobiologicznego tworząc gradient stężeń. W przypadku wrażliwości drobnoustroju na substancję znajdującą się w krążku, pojawi się wzrost drobnoustroju wokół tak zwanej strefy zahamowania wzrostu. Największym wyzwaniem wydaje się standaryzacja metody krążkowo-dyfuzyjnej, gdyż na ostateczny wynik testu ma wpływ wiele czynników, takich jak: zdolność substancji do wnikięcia w podłoże, penetracja w podłożu, możliwe interakcje chemiczne ze składnikami bibuły lub pożywki. Metoda krążkowo-dyfuzyjna może być wykorzystywana w badaniach nad NPs, należy jednak mieć na uwadze brak standaryzacji metody w odniesieniu do NPs²⁶.

Metoda seryjnych rozcieńczeń jest metodą referencyjną w określaniu wrażliwości drobnoustrojów na substancje chemiczne. Polega na zastosowaniu kolejnych rozcieńczeń badanej substancji w stałych objętościach pożywki oraz takim samym inokulum bakteryjnym. Umożliwia to określenie MIC. Metoda seryjnych rozcieńczeń jest szeroko stosowana w badaniach naukowych, zapewnia bowiem możliwość precyzyjnego określenia MIC, pozbawiona jest natomiast ograniczeń metody krążkowo-dyfuzyjnej. Zgodnie z zaleceniami CLSI i EUCAST, odczyt wartości MIC dla badanych antybiotyków powinien odbywać się za pomocą nieuzbrojonego oka. Nie w każdej sytuacji odczyt może odbywać się w ten sposób, gdyż niektóre substancje, na przykład NPs, mogą agregować na dnie płytek i utrudniać odczyt. W takim przypadku konieczna jest weryfikacja odczytu za pomocą innych technik, między innymi przy użyciu spektrofotometrii czy barwienia resazuryną²⁷. Po zakończeniu inkubacji płytek i odczycie MIC przy pomocy oka nieuzbrojonego dodaje się resazuryną i następnie inkubuje płytki

przez ok. 3 h. Po tym czasie fioletowa rezazuryna jest redukowana przez żywe organizmy do różowej rezorufiny i możliwy jest ponowny precyzyjny odczyt MIC. Przykładowy wynik testu z rezazuryną przedstawiono na ryc. 4.



Ryc. 4. Płytką 96-dolkową na której w poziomych rzędach od dolka 1 do 10 wykonano seryjne rozcieńczenia danego rodzaju NPs, dołek 11 stanowił kontrolę dodatnią, a dołek 12 kontrolę ujemną. Czarna strzałka wskazuje wartość MIC.

1.1.7 Metody oceny cytotoksyczności AgNPs

Oznaczanie cytotoksyczności związków chemicznych *in vitro* stanowi jedno z najważniejszych badań oceny toksykologicznej poprzedzającej rozpoczęcie badań *in vivo* i ewentualnego wdrożenia substancji do użytku. Ocena cytotoksyczności odbywa się na modelach komórkowych ludzkich lub zwierzęcych. Najczęściej wykorzystywane są komercyjnie dostępne linie komórkowe, które są szczegółowo scharakteryzowane oraz łatwiejsze w hodowli. W przypadku badań nad cytotoksycznością związków na skórze stosowane są linie keratynocytów i fibroblastów. Istnieje wiele różnych testów oceniających cytotoksyczność związków opierających się na zasadzie ilościowego pomiaru bezpośredniego żywotności komórek lub oznaczeniu aktywności markera, który jest pośrednim wskaźnikiem żywotności. Testy opierające się na reakcji redukcji soli tetrazolowej (MTT, XTT i WST) są jednymi z najbardziej popularnych. W testach wykorzystywana jest zdolność żywych komórek do przeprowadzenia redukcji substratu

jakim są (MTT, XTT, WST) przez enzymy oksydoredukcyjne zawarte w mitochondriach oraz zmiana barwy substratów po reakcji redox. W martwych komórkach reakcje redox nie zachodzą i barwne produkty nie powstają. Test przeprowadza się po określonym czasie inkubacji komórek z badanym związkiem, najczęściej 24 lub 48h. Wyniki testów z wykorzystaniem soli tetrazolowej odczytywane są spektrofotometrycznie i na tej podstawie wyznaczany jest parametr IC50, czyli takie stężenie badanej substancji, które hamuje wzrost 50% komórek.

1.2 Rola AgNPs jako substancji przeciwdrobnoustrojowej

Nanotechnologia jest bardzo szybko rozwijającą się dziedziną nauki. Nanomateriały są szeroko wykorzystywane w przemyśle i zaczynają być stosowane w medycynie z uwagi na swoje unikatowe właściwości różne od ich makroskopowych odpowiedników. Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazują NPs metali, szczególnie AgNPs. AgNPs mogą stanowić dodatek do implantów kostnych, przez co zmniejszać ryzyko rozwoju biofilmu bakteryjnego oraz zainfekowania implantu¹⁶. Roztworem AgNPs można impregnować się nici chirurgiczne, czy też kaniule żyłne²⁸. Trwają badania nad stworzeniem opatrunków hydrożelowych zawierających AgNPs²⁹. Tak więc możliwości zastosowania AgNPs w medycynie jest wiele.

Uważa się, że NPs wykazują wielokierunkowe działanie niszczące komórki bakteryjne, a brak konkretnego celu molekularnego sprawia, że potencjalne możliwości wytworzenia mechanizmów oporności są mniejsze. W pierwszym etapie po zastosowaniu AgNPs na komórki bakteryjne dochodzi do uszkodzenia ściany i błony komórkowej. AgNPs oddziałują z peptydoglikanami ściany komórkowej i doprowadzają do rozerwania wiązań β pomiędzy kwasami N-acetyloglukozamidowym i N-acetylmuraninowym³⁰. Ponadto AgNPs niszczą mureinę zawartą w ścianie komórkowej bakterii, gdyż reagują z zawartymi w tym białku grupami tiolowymi (-SH)¹⁰. Niszczenie błony komórkowej odbywa się również wielokierunkowo. AgNPs doprowadzają do powstania mikroporów w błonie komórkowej, co zwiększa ich przepuszczalność¹⁵. Dochodzi do niszczenia mostków białkowych w fosfolipidach, a także zaburzenia struktury peptydoglikanów³¹. Ponadto AgNPs stymulują wytwarzanie reaktywnych form tlenu, które w procesie peroksydacji lipidów niszczą błony biologiczne³². Wolne rodniki uszkadzają także enzymy łańcucha oddechowego^{30,33}. Uważa się, że AgNPs mają zdolność powolnego uwalniania jonów srebra przez AgNPs we wnętrzu komórki, co doprowadza do interkalacji z DNA i białkami zawierającymi grupy tiolowe³².

Istnieje jeszcze wiele kwestii, które wymagają wyjaśnienia i udowodnienia w badaniach naukowych zanim AgNPs zostaną wprowadzone do leczenia na szeroką skalę. Nadal brak jest danych umożliwiających odpowiedź na pytanie co wpływa na siłę działania biologicznego nanocząstek. Wiadomym jest że im mniejszy rozmiar tym siła działania przeciwdrobnoustrojowego jest większa, zwiększa się jednak również cytotoksyczność NPs^{30,34}. Kształt AgNPs jest czynnikiem modulującym działanie

przeciwdrobnoustrojowe³⁵. Istnieją hipotezy, że czynnik opłaszczający wpływa na działanie NPs, jednak wymaga to dodatkowych badań³⁶. Rola innych czynników mogących wpływać na zachowanie NPs nie jest poznana. Ważnym problemem jest trwałość AgNPs. Możliwości syntezy AgNPs jest wiele, natomiast tylko niektóre metody zapewniają otrzymanie produktów stabilnych w dłuższym okresie czasu np. tydzień³⁷. W przypadku impregnacji implantów tkankowych ważnym jest żeby substancja przeciwbakteryjna działała również po implantacji, a nie agregowała po kilku dniach od stworzenia implantu. Poza tym wyjaśnienia wymaga kwestia uwalniania AgNPs z materiału do którego została dodana oraz możliwe interakcje z tym materiałem.

Odrębnym problemem jest cytotoksyczność AgNPs oraz interakcje z tkankami żywych organizmów³⁸. Zastosowanie NPs w formie miejscowej wydaje się nieść mniejsze ryzyko niż stosowanie ogólnoustrojowe AgNPs. W przypadku zastosować na skórę ważnym problemem jest cytotoksyczność dla keratynocytów i fibroblastów oraz możliwości przenikania AgNPs przez skórę³⁹⁻⁴¹. Niestety opinie naukowców w tej sprawie są sprzeczne i potrzeba jest większej ilości danych na ten temat. Jeszcze mniej wiadomo na temat zastosowania ogólnoustrojowego NPs.

1.3 Rola szczepów gronkowca złocistego w chorobach skóry

Gronkowiec złocisty (łac. *Staphylococcus aureus*) – *S. aureus* to bakteria Gram - dodatnia kulistego kształtu, mająca zdolność produkcji szeregu toksyn stanowiących czynniki zjadliwości. Ponadto *S. aureus* wykazuje duże zdolności do wykształcania czynników oporności na antybiotyki. Najpopularniejszym z nich jest gen *mecA*, który koduje ekspresję białka warunkującego oporność na metycylinę⁴². Tempo generowania czynników oporności w przypadku *S. aureus* jest bardzo duże, gdyż szczepy mają zdolność do przekazywania czynników oporności między sobą. Już rok po wprowadzeniu do leczenia penicyliny odnotowano szczepy odporne na ten antybiotyk⁴³. Podobna sytuacja zaistniała po wprowadzeniu do leczenia infekcji gronkowcowych daptomycyny w 2003r⁴⁴. Pomimo restrykcji dotyczących użycia antybiotyku oporność *S. aureus* na daptomycynę wynosiła od 0,05 do 20%⁴⁵. *S. aureus* to patogen wywołujący szereg różnych zakażeń, w tym posocznicę. Jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń skóry i tkanek miękkich. Wywołuje takie choroby jak: zapalenie mieszków włosowych, czyrączność, ropnie mnogie niemowląt, gronkowcowy zespół oparzonej skóry *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (SSSS). Ponadto *S. aureus* bierze udział w wywoływaniu infekcji mieszanych takich jak niesztowica czy liszajec zakaźny². Jest to jeden z najczęściej izolowanych patogenów z ran przewlekłych⁴⁶. Infekcje gronkowcowe mogą być również czynnikiem zaostrzającym przebieg przewlekłych dermatoz takich jak atopowe zapalenie skóry⁴⁷. Gronkowiec złocisty może być również składnikiem mikrobiomu człowieka. Obecność *S.aureus* w przedsionku nosa w populacji ogólnej stwierdza się w 10-30% , natomiast u chorych na atopowe zapalenie skóry odsetek ten sięga ok. 60%^{48,49}.

Ze względu na wysoki potencjał *S. aureus* do tworzenia oporności na antybiotyki oraz duży udział tego patogenu w chorobach skóry poszukiwane są nowe substancje przeciwostronkowcowe, które powinny charakteryzować się wielokierunkowym działaniem utrudniającym tworzenie czynników oporności.

2. Cele pracy

1. Opracowanie metody syntezy kinetycznie stabilnych AgNPs
2. Ocena wpływu oczyszczania AgNPs za pomocą dializy na działanie przeciwdrobnoustrojowe AgNPs
3. Ocena stabilności kinetycznej AgNPs oraz siły działania przeciwegronkowcowego w czasie
4. Ocena wpływu substancji opłaszczającej na działanie przeciwegronkowcowe AgNPs
5. Ustalenie struktury badanych AgNPs przy pomocy metod fizykochemicznych
6. Wyselekcjonowanie AgNPs o silnym działaniu przeciw gronkowcowym i niskiej cytotoksyczności wobec komórek skóry, które potencjalnie mogłyby być wykorzystane do badań naukowych i zastosowań medycznych

3. Materiały i metody

3.1 Materiały

Wszystkie odczynniki zostały zakupione w Sigma Aldrich i używane bez wcześniejszego oczyszczania. Użyte roztwory były oczyszczane i destylowane.

Szczepy referencyjne *S. aureus* pochodziły z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PAN Wrocław). Szczepy kliniczne były izolowane od Pacjentów Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego po wcześniejszym uzyskaniu zgody komisji bioetycznej oraz zgód pacjentów. Szczepy były zakodowane w sposób uniemożliwiający identyfikację pacjenta zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych.

Jednorazowy sprzęt i pożywki bakteryjne były zakupione w Biomaxima S.A.

Używano następujących modeli sprzętów: spektrofotometr - UV-VIS Hitachi U-1900 firmy Hitachi High-Technologies Corporation, spektrofotometr Multiscan GO 3.2, liofilizator laboratoryjny Lyovac GT2E typ 11, analizator elementarny Vario EL III firmy Elementar, spektrometr FTIR Jasco 6200

3.2 Metody

3.2.1 Synteza AgNPs

Dokonano systematycznego przeglądu literatury dotyczącego syntezy AgNPs. Powtarzano zgodnie ze wskazówkami sposób syntezy AgNPs oraz sprawdzano stabilność NPs w czasie. Dostateczną trwałością wykazały się AgNPs opłaszczane PVP, których wytwarzanie opisała Malina i wsp¹⁹. Na tej podstawie dokonano syntezy AgNPs opłaszczanych PVP z pewnymi modyfikacjami. Użyto polimerów o różnych masach cząsteczkowych: 3,5 KDa, 10KDa, 25KDa, 40KDa i 55KDa.

Metodę syntezy AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi (AgNPsC) oraz estrami kwasu bursztynowego i długołańcuchowych alkoholi (AgNPsB) opracował Prof. Ryszard Ostaszewski z Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk.

Synteza odbywała się w następujący sposób: 40 ml 4% roztwór kwasu karboksylowego podgrzewano w łaźni wodnej na mieszadle magnetycznym do 40 °C. Następnie dodawano 80 mg azotanu srebra i 40mg borowodoru sodu. W ten sposób

otrzymywano AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi o różnej długości łańcucha węglowego. Za pomocą spektrofotometru (2800 UV-vis, UNICO, NJ, USA) weryfikowano przebieg reakcji syntezy NPs wyznaczając widma UV-vis w czasie dodania czynnika redukującego, oraz co 10 min do momentu uzyskania dwóch identycznych widm. Analogicznie badano trwałość NPs w czasie⁵⁰. Wykorzystano fakt, iż NPs poddają się powierzchniowemu rezonansowi plazmonowemu i pochłaniają falę świetlną o długości ok. 400nm.

3.2.2 Oczyszczanie AgNPs

Mieszaninę poreakcyjną NPs oczyszczano za pomocą dializy. Dializę rozpoczynano natychmiast po zakończeniu reakcji syntezy NPs. Stosowano błony dializacyjne o wielkości otworów 8-10nm (Spectra/Pro Biotech) (wyniki dializy przez błonę 1nm były porównywalne). Wypełnioną roztworem NPs błonę umieszczano w roztworze wodnym (woda destylowana) wykonując pomiary spektrofotometryczne próbek pobranych z obu cieczy. Dializę prowadzono do tego momentu, w którym widmo roztworu dializacyjnego było identyczne z widmem wody.

Do badań nad wpływem zanieczyszczeń mieszaniny poreakcyjnej na działanie przeciwegronkowcowe użyto AgNPs opłaszczanych następującymi kwasami karboksylowymi: C10, C11, C12, C13, C14, C15 oraz opłaszczanych PVP takimi jak: PVP 3,5, PVP 10, PVP 25, PVP 40 i PVP 55. Mieszaniny poreakcyjne dzielono na dwie równe części z których jedną poddawano procesowi oczyszczania (nazwano poszczególne roztwory zgodnie z algorytmem: nanocząstka srebra, rodzaj substancji opłaszczającej, dializowana (D) / niedializowana(ND), np.: AgNPsC10D), a drugą pozostawiono jako roztwór kontrolny.

3.2.3 Badania stabilności kinetycznej AgNPs

Weryfikowano trwałość otrzymanych AgNPs wyznaczając krzywe tempa rozpadu NPs stosując serię pomiarów spektrofotometrycznych codziennie przez 14 dni. Do badań nad stabilnością AgNPs wykorzystano roztwory wodne NPs opłaszczanych kwasami (karboksylowymi składającymi się od 2 do 17 atomów węgla w cząsteczce (przy użyciu kwasu 16-węglowego nie było możliwe otrzymanie AgNPs w postaci roztworu wodnego, AgNPs tworzą żel; dlatego nie kontynuowano badań przy użyciu kwasów o dłuższym

łańcuchu). Analogiczne pomiary wykonano dla AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego i PVP.

Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych wyselekcjonowano AgNPs o największej stabilności kinetycznej i tylko te NPs użyto do testów mikrobiologicznych. Sprawdzano aktywność przeciwdrobnoustrojową AgNPs opłaszczanych PVP, kwasami karboksylowymi w czasie, za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń opisanej poniżej. Przed każdym testem mikrobiologicznym roboczo wykonywano pomiary spektrofotometryczne, celem sprawdzenia obecności nanocząstek w roztworach.

3.2.4 Charakterystyka fizykochemiczna AgNPs

Badania fizykochemiczne zostały przeprowadzone w Instytucie Chemii Organicznej oraz Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk dzięki uprzejmości i wsparciu merytorycznemu Prof. Ryszarda Ostaszewskiego oraz inż. Patrycji Wardaszki.

Wykorzystano techniki spektrofotometrii UV-vis, spektrometrii IF, DLS oraz analizy elementarnej. Z uwagi na wysoki koszt badań pomiary wykonano dla AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi (C11, C12, C13, C14 i C15) oraz wybranych roztworów AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego (B10, B12, B14 i B16). AgNPs PVP scharakteryzowane zostały przez Malina i wsp, a wyniki analiz przedstawiono w publikacji¹⁹.

Metoda spektrofotometrii UV-vis, jako najprostsza, tania i szybka do wykonania, posłużyła do szacowania rozmiarów otrzymywanych AgNPs oraz stabilności kinetycznej roztworów w czasie. Pomiary spektrometryczne wykonywano w trakcie procesu syntezy, po jej zakończeniu oraz przed analizami mikrobiologicznymi. Pobierano próbki roztworów, które rozcieńczano w wodzie. Przed przystąpieniem do pomiarów mierzono masę roztworu AgNPs oraz masę rozpuszczalnika celem ustalenia stężenia roztworu. Próbkę umieszczano w kuwecie pomiarowej o szerokości 1cm. Następnie wykonywano pomiary spektrofotometryczne.

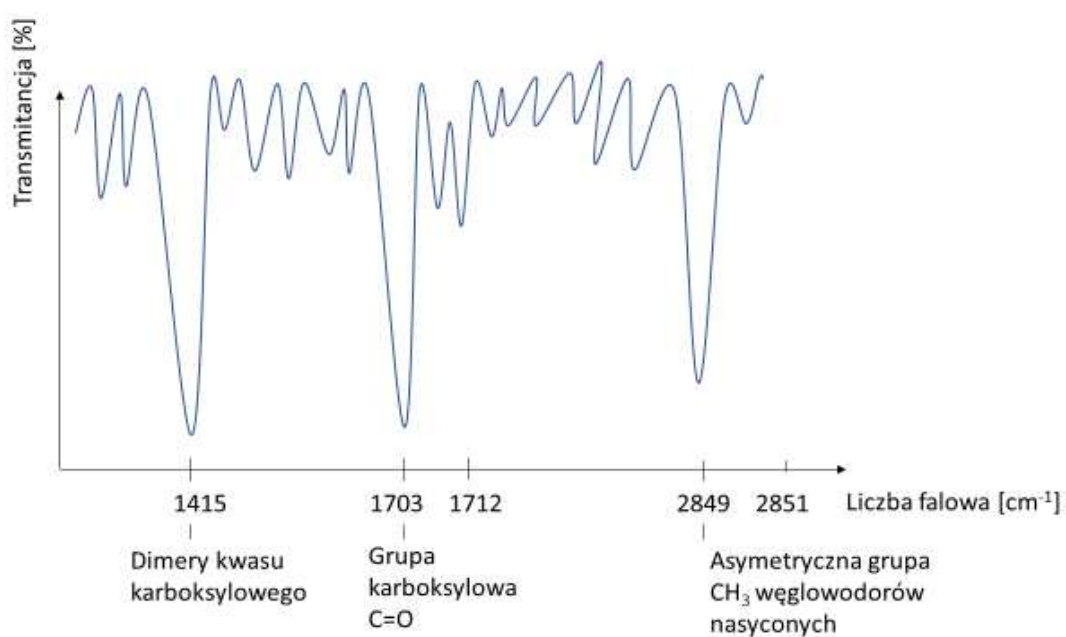
Ustalenie szczegółowych dane syntezowanych AgNPs wymagało zastosowania wysokospecjalistycznych metod fizykochemicznych.

Metodę DLS wykorzystano do określenia rozmiaru i polidispersji AgNPs.

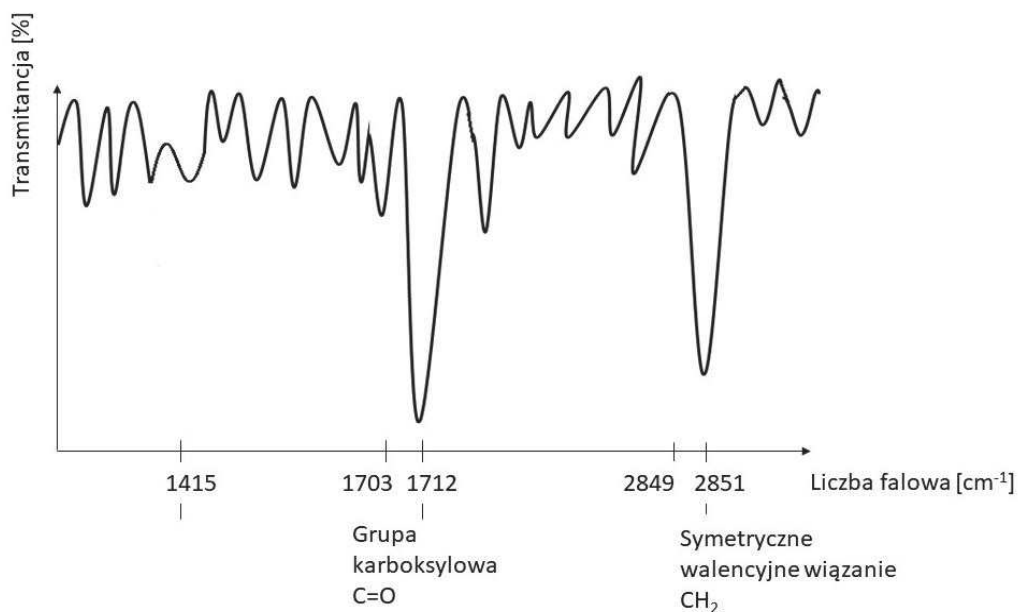
Metodę analizy elementarnej użyto do oceny składu pierwiastkowego AgNPs po zakończeniu procesu syntezy. Oczyszczone za pomocą dializy roztwory AgNPs

liofilizowano, a następnie spalano w analizatorze elementarnym. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było obliczenie stosunku liczby atomów węgla przypadających na jeden atom srebra. Wyniki analizy pozwoliły wnioskować o gęstości opłaszczenia AgNPs przez czynniki opłaszczające.

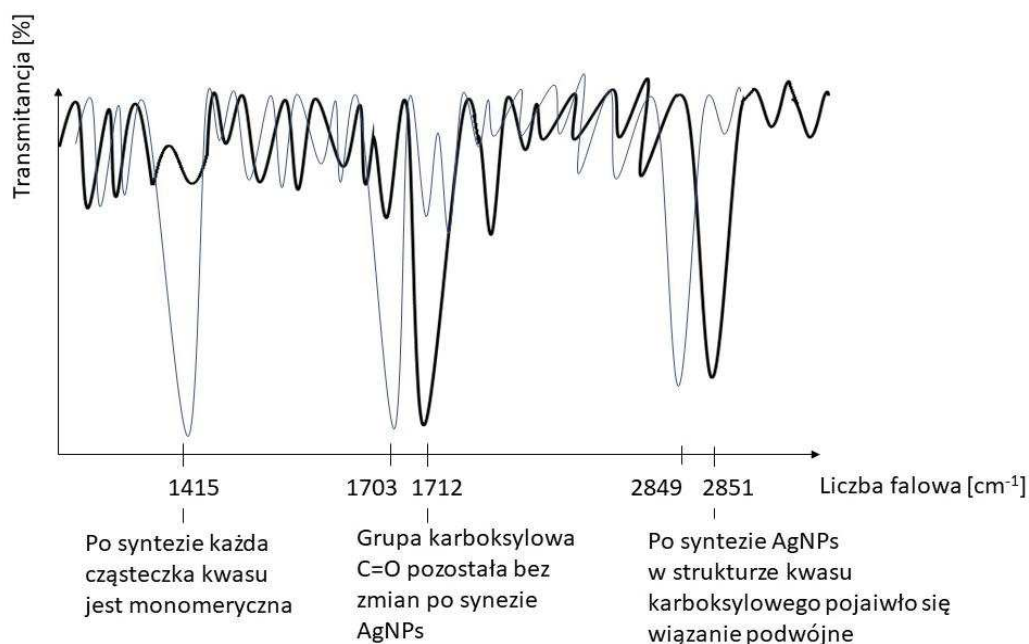
Metodę IR użyto w celu określenia budowy chemicznej substancji opłaszczających NPs. Porównanie krzywych transmitancji od liczby falowej dla poszczególnych czynników opłaszczających pozwoliło na analizę zmian czynnika opłaszczającego w czasie syntezy AgNPs. Przykładowy proces analizy krzywych przedstawiono na wykresach. 2, 3, 4.



Wykres 2. Krzywa transmitancji od liczby falowej dla cząsteczki kwasu karboksylowego C15.



Wykres 3. Krzywa transmitancji od liczby falowej dla cząsteczki kwasu karboksylowego pentadekanowego oplaszczającej AgNPs.



Wykres 4. Nałożone krzywe transmitancji od liczny falowej przedstawiające zmiany w budowie cząsteczki kwasu karboksylowego przed i po syntezie AgNPs. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że grupa funkcyjna kwasu karboksylowego pozostała, natomiast w łańcuchu karboksylowym pojawiło się wiązanie nienasycone. Poza tym kwasy karboksylowe nie tworzą polimerów.

3.2.5 Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej AgNPs

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej AgNPs zostały przeprowadzone wobec referencyjnych oraz klinicznych szczepów *S. aureus* wyizolowanych z owrzodzeń

powstałych u pacjentów w przebiegu przewlekłej niewydolności żylnej. Wszystkie badane szczepy kliniczne oraz referencyjne zostały scharakteryzowane pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne.

Wszystkie badania mikrobiologiczne zostały przeprowadzone w odpowiednio wyposażonym laboratorium mikrobiologicznym Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dzięki uprzejmości prof. Wojciecha Kamysza.

Do badania aktywności przeciwegronkowcowej AgNPs wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń zaaprobowaną przez CLSI oraz EUCAST. Oznaczenia MIC zostały wykonane przy użyciu 96-dółkowych płytek mikrotitracyjnych. Otrzymane roztwory AgNPs rozcieńczono w wodzie destylowanej, względem zawartości srebra jonowego dodanego do reagentów reakcji syntezy, do stężenia 1000 ppm. Użyto płytek zawierających 96 rynienek o pojemności 200 µl każda. Wypełniono każdy dołek 100 µl płynnej pożywki bakteryjnej (bulion Mueller-Hinton – MH). Następnie dodawano po 100 µl roztworu NPs i wykonywano seryjne rozcieńczenia związków. Ostatnim etapem było dodanie roztworu 20 µl zawiesiny bakteryjnej (o gęstości 0.5 McFarlanda) do 10 ml bulionu. Płytki inkubowano w 37°C przez 16-20 godzin. Po inkubacji NPs z zawiesiną bakterii dochodziło często do agregacji ciemnoszarych osadów srebra na dnie płytki, dlatego po odczycie wartości MIC z płytek, używano resazuryny do weryfikacji tych odczytów. Po dodaniu resazuryny, płytki inkubowano przez 3 godziny. Wszystkie testy oraz odczyty powtórzono 3 krotnie. Jako ostateczny wynik uznano dominantę tych trzech pomiarów.

Badania dotyczące wpływu dializy na aktywność AgNPs wykonane zostały metodą seryjnych rozcieńczeń dla następujących rodzajów NPs: AgNPsPVP 3,5; AgNPsPVP 10; AgNPsPVP 25; AgNPsPVP 40; AgNPsPVP 55; AgNPsC10; AgNPsC11; AgNPsC12; AgNPsC13; AgNPsC14 w formie oczyszczonej i nieoczyszczonej.

Badania aktywności NPs w czasie wykonano przy użyciu dializowanych NPs: AgNPsPVP 3,5; AgNPsPVP 10; AgNPsPVP 25; AgNPsPVP 40; AgNPsPVP 55; AgNPsC10; AgNPsC11; AgNPsC12; AgNPsC13; AgNPsC14; AgNPsB10; AgNPsB12; AgNPsB14; AgNPsB16;

Do badań mikrobiologicznych dotyczących wpływu substancji opłaszczającej na działanie przeciwegronkowcowe AgNPs użyto dializowanych NPs: AgNPsPVP 3,5; AgNPsPVP 10; AgNPsPVP 25; AgNPsPVP 40; AgNPsPVP 55; AgNPsC10; AgNPsC11; AgNPsC12; AgNPsC13; AgNPsC14; AgNPsB10; AgNPsB12; AgNPsB14; AgNPsB16;

3.2.6 Badanie cytotoksyczności AgNPs na ludzkie keratynocyty

Testy cytotoksyczności przeprowadzono tylko dla AgNPs, których siła działania przeciwbakteryjnego była największa.

Badania wykonano dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Michała Pikuły w Laboratorium Kliniki Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Testy cytotoksyczności wykonała dr n. med. Milena Deptuła.

Keratynocyty HaCaT wysiano na płytki 96-dółkowe (5 tys./dółek) w pożywce DMEM HG (Sigma Aldrich) zawierającej 10% FBS (Sigma Aldrich). Po 24h pożywkę zmieniono na bezsurowiczą i komórki zastymulowano związkami. Po 24h inkubacji sprawdzono wpływ związków na proliferację przy pomocy testu XTT (Sigma Aldrich). Wyniki powtórzono czterokrotnie.

3.2.7 Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu „R”. Za poziom istotności statystycznej uznano wartość p (ang. *p value*) wynoszącą $p < 0,05$. Do analiz przyjęto schemat w którym analizowano wszystkie szczepy *S. aureus* jako jedną grupę, każdy z testów mikrobiologicznych powtórzono trzykrotnie uzyskując ostatecznie liczbę prób $n=18$. Do analiz statystycznych testów mikrobiologicznych wykorzystano średnią wartość MIC z poszczególnych analizowanych grup. Do analizy wpływu oczyszczania za pomocą dializy wykorzystano test U-Manna Whitneya, który jest testem nieparametrycznym służącym do porównania dwóch prób niezależnych. Powyższy test użyto również w celu porównania siły działania poszczególnych rodzajów AgNPs do AgNO_3 , a także do porównania działania poszczególnych AgNPs pomiędzy sobą. Analizy trwałości AgNPs w czasie wykonano przy użyciu nieparametrycznego testu Wilcoxa dla par obserwacji równolicznych próbek. Opracowanie statystyczne testów cytotoksyczności wykonano przy pomocy testu U-Manna Whitneya.

4. Wyniki

4.1 Synteza NPs

Wielokrotnie podejmowano próby powtórzenia procesu syntezy AgNPs na podstawie danych literaturowych. Otrzymywane AgNPs okazywały się jednak nietrwałe i ulegały agregacji w ciągu kilkunastu minut lub kilku godzin. Nieliczne zsyntezowane AgNPs wykazywały trwałość pozwalającą na przeprowadzenie testów mikrobiologicznych. Dostateczną trwałością wykazały się AgNPs opłaszczane PVP, których metodę syntezy opracowali Malina i wsp¹⁹. Również AgNPs opłaszczane jednonasyconym kwasem oleinowym zsyntezowane przez Li i wsp. charakteryzowały się wysoką trwałością⁵¹. Z uwagi na złożoność budowy kwasu oleinowego, postanowiono opracować metodę syntezy AgNPs opłaszczanych nasyconymi kwasami tłuszczowymi.

Aby zmaksymalizować możliwości porównania AgNPs pomiędzy sobą postanowiono zminimalizować liczbę czynników różniących poszczególne rodzaje molekuł. W związku z tym użyto jednej metody syntezy dla wszystkich badanych AgNPs. Syntezę AgNPs wykonano metodą chemiczną z użyciem azotanu srebra oraz borowodoru sodu, jako czynnika redukującego. Jako substancji opłaszczającej użyto PVP, kwasów karboksylowych oraz estrów kwasu bursztynowego

Wykonano następującą reakcję chemiczną:



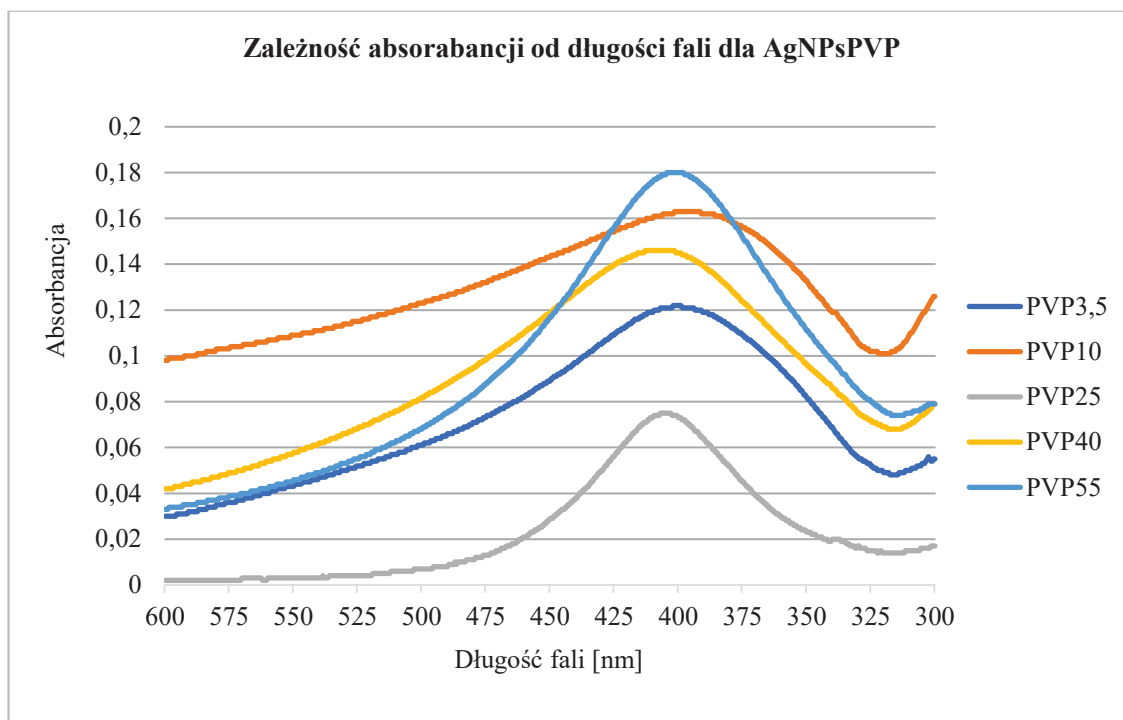
W wyniku redukcji jonów srebra powstają AgNPs o ciemnym zabarwieniu, co wynika z właściwości optycznych NPs. Weryfikację otrzymanego produktu reakcji potwierdzano przy pomocy pomiarów spektrofotometrycznych wykonywanych po zakończeniu syntezy dla każdego roztworu. Na ryc. 5 przedstawiono barwną reakcję tworzenia AgNPs.



Ryc. 5. Na fotografii po lewej stronie znajduje się roztwór stabilizatora oraz azotanu srebra, zdjęcie po prawej stronie pokazuje moment tworzenia się AgNPs w trakcie dodawania substancji redukującej.

4.1.1 Synteza AgNPs opłaszczanych PVP

Na podstawie metody opisanej przez Malina i wsp.¹⁹ dokonano syntezy AgNPs opłaszczanych PVP z pewnymi modyfikacjami oraz przeprowadzono analizę stabilności kinetycznej NPs. Na wykresie 5 przedstawiono krzywe absorbancji dla poszczególnych mieszanin poreakcyjnych (sposób analizy krzywych omówiono w rozdziale 1.1.5.1.1) Wszystkie badane roztwory charakteryzował typowy dla nanocząstek kształt krzywej absorbancji, co potwierdza że dokonano syntezy AgNPs. Punkt maksimum absorbancji dla badanych roztworów oscylował wokół wartości 400 nm, oznacza to że zsyntezowane AgNPs charakteryzowały się zbliżonym rozmiarem. Poszczególne roztwory różniły się stężeniami AgNPs i dlatego punkty maximum absorbancji dla roztworów są różne.

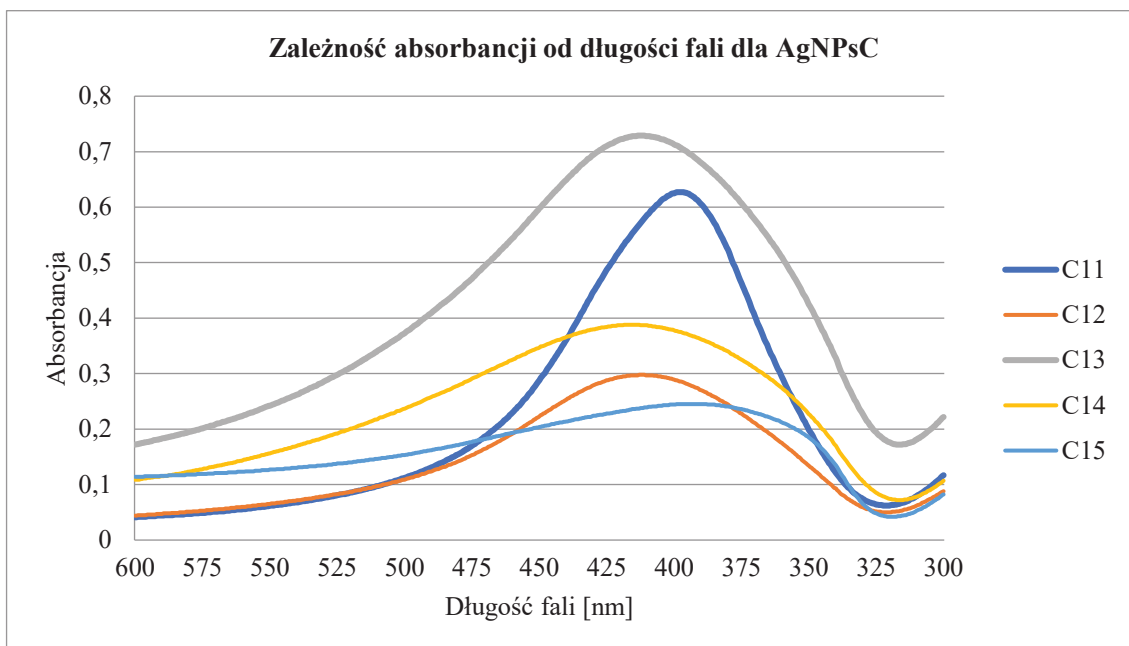


Wykres 5. Krzywe absorbancji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykonane po zakończeniu procesu syntezy.

4.1.2 Synteza AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi

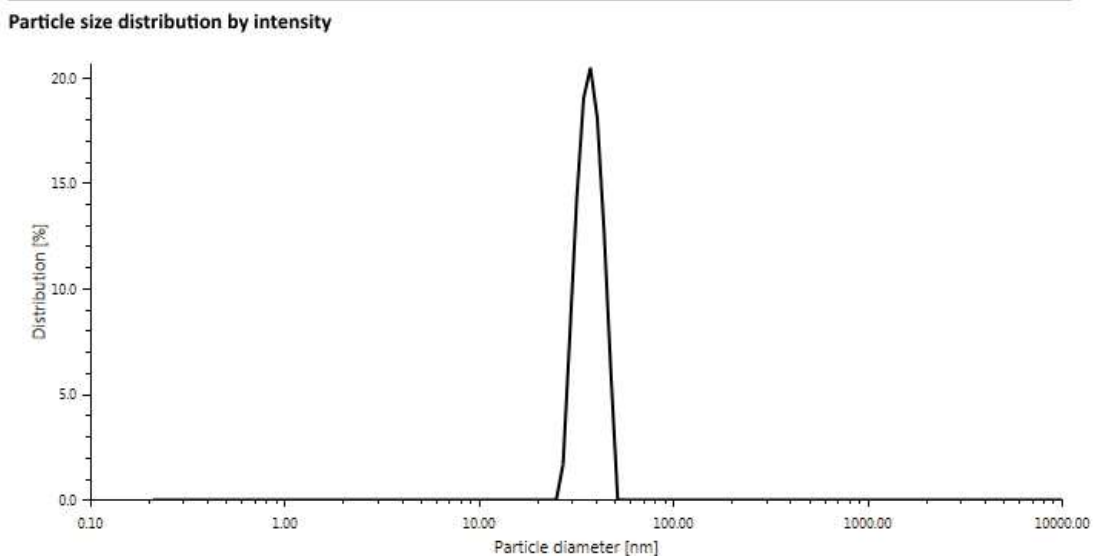
Syntezę AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykonywano przy użyciu kwasów karboksylowych nasyconych systematycznie zwiększając liczbę węgli w łańcuchu węglowym.

Po zakończeniu syntezy, spektrofotometrycznie potwierdzono obecność struktur „nano” we wszystkich mieszaninach poreakcyjnych. Stwierdzono, iż AgNPs o długości łańcucha węglowego od 2 do 9 węgli nie mogą być użyte do badań biologicznych, gdyż ulegają agregacji w ciągu 24h od zakończenia procesu syntezy. Natomiast zbyt długi łańcuch węglowy użyty do opłaszczenia AgNPs powoduje, że roztwór tworzy gęsty żel. Powyższe wyniki przedstawiono szczegółowo w rozdziale 4.2.1.2. w tabeli 4. Dla AgNPs użytych do badań mikrobiologicznych przedstawiono krzywe UV-vis na wykresie 6. Wartości długości fali w punkcie maksimum absorpcyjnego dla wyselekcjonowanych AgNPs wahały się od 394 do 416nm, świadczy to o podobnym rozmiarze molekuł wynoszącym około 30 - 40 nm. C11 i C15 są nieznacznie mniejsze od C12, C13 i C14.



Wykres 6. Krzywe absorbancji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPsC opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykonane po zakończeniu procesu syntezy.

Wyniki spektrofotometryczne weryfikowano przy użyciu techniki DLS, dzięki której możliwe jest precyzyjne określenie rozmiaru AgNPs. Długość fali wiązki światła laserowego wynosiła 658nm. Badaniu poddano wszystkie NPs opłaszczone prostymi kwasami karboksylowymi i estrami kwasu bursztynowego, jednak średnicę hydrodynamiczną udało się zmierzyć tylko dla C11 – wyniosła ona 66 nm, oraz dla NPs opłaszczanych C15 - 47 nm. Na wykresie 7 przedstawiono przykładowy wynik pomiaru średnicy hydrodynamicznej dla C15.

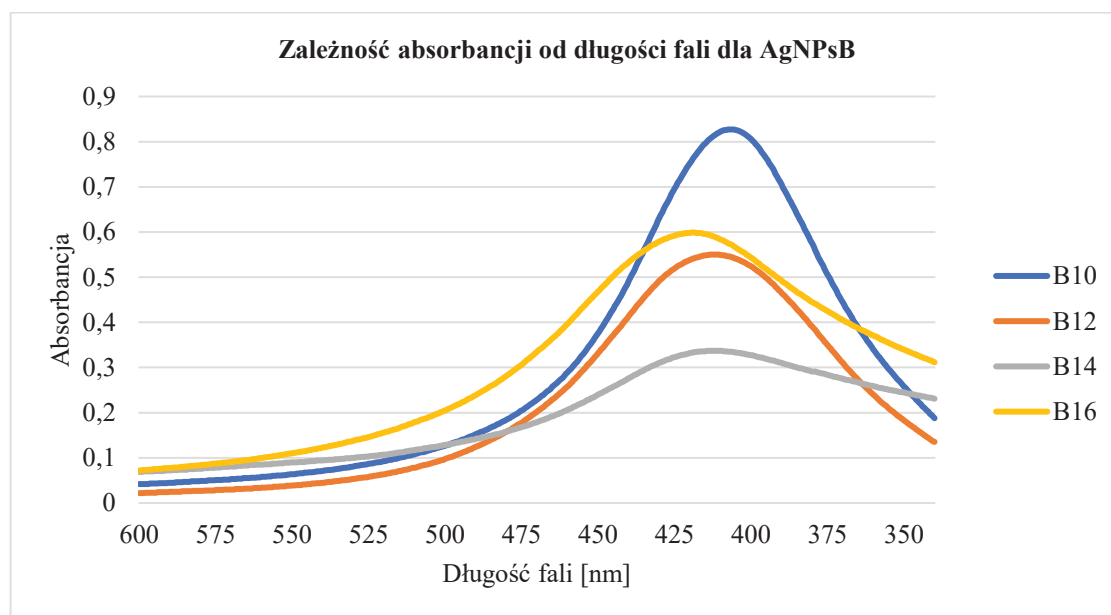


Wykres 7. Wynik analizy DLS dla C15.

4.1.3 Synteza AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego

Postanowiono dokonać modyfikacji struktury substancji opłaszczającej, aby wydłużyć łańcuch węglowy i uzyskać AgNPs o długim łańcuchu, które pozostaną w formie cieczy (AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi o łańcuchu zawierającym ponad 16 węgli tworzyły postać żelu). Taką substancją okazały się być estry kwasu bursztynowego i alkoholi długołańcuchowych. Dokonano syntezy AgNPs i w sposób systematyczny zwiększano o dwa liczbę węgli w łańcuchu karboksylowym alkoholi rozpoczynając od dekanolu i kończąc na heksadekanolu.

Wykres 8 przedstawia widma UV-vis dla otrzymanych AgNPs, podobnie jak w przypadku pozostałych roztworów NPs, otrzymanym produktem reakcji są NPs, o zbliżonym rozmiarze i różnym stężeniu roztworów. Długość fali w punkcie maximum absorpcji dla roztworów wahała się od 404 nm do 420 nm, co oznacza, że zwiększanie liczby węgli w łańcuchu alkoholu wpływa na zwiększenie rozmiaru AgNPs. Średni rozmiar AgNPs wynosi ok. 50nm.



Wykres 8. Krzywe absorpcji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego wykonane po zakończeniu procesu syntezy.

4.2 Ocena stabilności kinetycznej AgNPs oraz siły działania przeciwgronkowcowego AgNPs w czasie

4.2.1 Ocena stabilności kinetycznej AgNPs

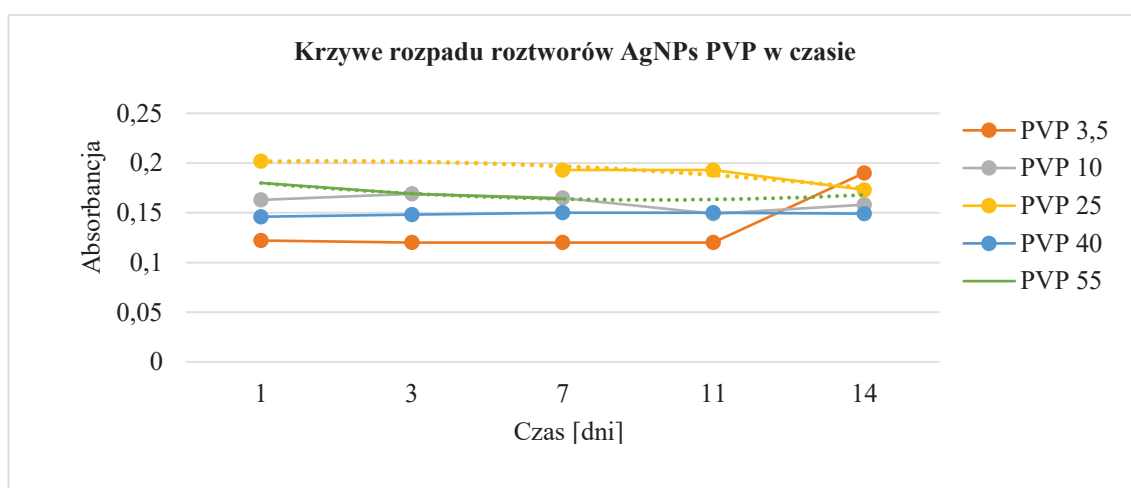
Stabilność kinetyczna roztworu AgNPs oznacza, że proces agregacji NPs zachodzi bardzo wolno i w roztworze nie dochodzi do spadku stężenia AgNPs (spłaszczenie krzywej UV-vis) na rzecz zwiększenia molekuł (przesunięcie w prawo punktu maksimum) czyli powstawania agregatów. W stabilnym roztworze AgNPs wygląd krzywej UV-vis nie ulega znaczącym zmianom.

4.2.1.1 AgNPs opłaszczane PVP

Wszystkie rodzaje AgNPs PVP wykazywały stabilność kinetyczną w czasie trwania eksperymentu tj. 14 dni, co potwierdzano przy pomocy pomiarów spektrofotometrycznych UV-vis. W tabeli 2 przedstawiono wartości maksimum absorbancji i odpowiadającej jej długości fali dla poszczególnych roztworów, pozostawionych w kuwetkach przez cały czas trwania eksperymentu, co umożliwiło utrzymanie roztworów w tym samym stężeniu roztworu NPs (próbki zabezpieczono przed parowaniem folią). Na wykresie 9 pokazano krzywe rozpadu dla AgNPs PVP. Badane roztwory nie wykazały znaczących różnic dla długości fali oraz zmian absorbancji, co oznacza że AgNPs nie zmieniły rozmiaru i w roztworze nie doszło do agregacji. Największe zmiany, jednakże nie istotne z makroskopowego punktu widzenia, odnotowano w przypadku roztworu PVP 25. Zaobserwowano stopniowe zwiększanie długości fali w ciągu 14 dni od zakończenia syntezy, od 430 nm do 455 nm, oznacza to że NPs zawarte w roztworze zwiększyły rozmiar z ok. 60 nm do ponad 100 nm. Warto zwrócić uwagę, że maksimum absorbancji w tym roztworze stopniowo malało, od 0,202 do 0,173, co świadczy o zmniejszeniu stężenia AgNPs w roztworze na rzecz powstającego srebra koloidalnego w procesie agregacji.

Substancja opłaszczająca	Dzień syntezy		7 dni po zakończeniu syntezy		14 dni po zakończeniu syntezy	
	λ_{max} [nm]	Ab_{max}	λ_{max} [nm]	Ab_{max}	λ_{max} [nm]	Ab_{max}
PVP 3,5	400	0,122	400	0,12	403	0,19
PVP 10	396	0,163	396	0,165	396	0,158
PVP 25	430	0,202	447	0,193	455	0,173
PVP 40	407	0,145	408	0,15	407	0,149
PVP 55	401	0,18	401	0,164	402	0,168

Tabela 2. Zmiana absorpcji w czasie i długości fali odpowiadające maksimum absorpcji dla poszczególnych rodzajów AgNPs opłaszczanych PVP.



Wykres 9. W formie wykresu przedstawiono zmianę absorpcji od czasu dla badanych roztworów AgNPsPVP.

Podsumowano otrzymane wyniki w tabeli 3, pokazując iż wszystkie AgNPs opłaszczane PVP wykazywały trwałość przez przynajmniej 14 dni, co umożliwia prowadzenie badań biologicznych na tego rodzaju NPs.

Numer	AgNPs opłaszczane PVP o następujących masach	Skrótowa nazwa	Trwałość AgNPs 24h po zakończeniu syntezy	Trwałość AgNPs po 7 dniach od zakończenia syntezy	Trwałość AgNPs po 14 dniach od zakończenia syntezy
1	3,5 kDa	PVP 3,5	+	+	+
2	10 kDa	PVP 10	+	+	+
3	25 kDa	PVP 25	+	+	+
4	40 kDa	PVP 40	+	+	+
5	55 kDa	PVP 55	+	+	+

Tabela 3. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPs opłaszczanych PVP.

4.2.1.2 AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi

Cyklicznie powtarzano pomiary widm UV-vis. Na podstawie zmian długości fali odpowiadających maksimum absorpcji wnioskowano o stabilności kinetycznej roztworów AgNPs, czyli tendencji do agregacji NPs. Stwierdzono, że AgNPs opłaszczane kwasami krótkołańcuchowymi tj. począwszy od kwasu octowego (C2), a skończywszy na kwasie nonanowym (C9) ulegały agregacji przed upływem 24h od zakończenia syntezy. AgNPs opłaszczone kwasem dekanowym (C10) wykazywały stabilność kinetyczną przez 4 dni. AgNPs opłaszczone długołańcuchowymi kwasami karboksylowymi: undodekanowym (C11), laurynowym (C12), tridekanowym (C13), mirystynowym (C14) i pentadekanowym (C15) wykazywały stabilność przez cały czas trwania eksperymentu. AgNPs opłaszczane kwasami o większej niż 15 atomów węgla w cząsteczce tworzyły postać żelu. Pomiary spektrofotometryczne oraz dalsze badania mikrobiologiczne nie były możliwe dla C16 AgNPs. Podsumowanie wyników stabilności kinetycznej poszczególnych roztworów pokazano w tabeli 4. Na szaro zaznaczono substancje użyte do dalszych badań.

Numer	AgNPs opłaszczone kwasem karboksylowym	Skrótowa nazwa	Trwałość AgNPs 24h po zakończeniu syntezy	Trwałość AgNPs po 7 dniach od zakończenia syntezy	Trwałość AgNPs po 14 dniach od zakończenia syntezy
1	CH ₃ COOH	C2	-	-	-
2	C ₂ H ₅ COOH	C3	-	-	-
3	C ₃ H ₇ COOH	C4	-	-	-
4	C ₄ H ₉ COOH	C5	-	-	-
5	C ₅ H ₁₁ COOH	C6	-	-	-
6	C ₆ H ₁₃ COOH	C7	-	-	-
7	C ₇ H ₁₅ COOH	C8	-	-	-
8	C ₈ H ₁₇ COOH	C9	-	-	-
9	C ₉ H ₁₉ COOH	C10	+	-	-
10	C ₁₀ H ₂₁ COOH	C11	+	-	-
11	C ₁₁ H ₂₃ COOH	C12	+	+	+
12	C ₁₂ H ₂₅ COOH	C13	+	+	+
13	C ₁₃ H ₂₇ COOH	C14	+	+	+
14	C ₁₄ H ₂₉ COOH	C15	+	+	+
15	C ₁₅ H ₃₁ COOH	C16	Postać żelu		

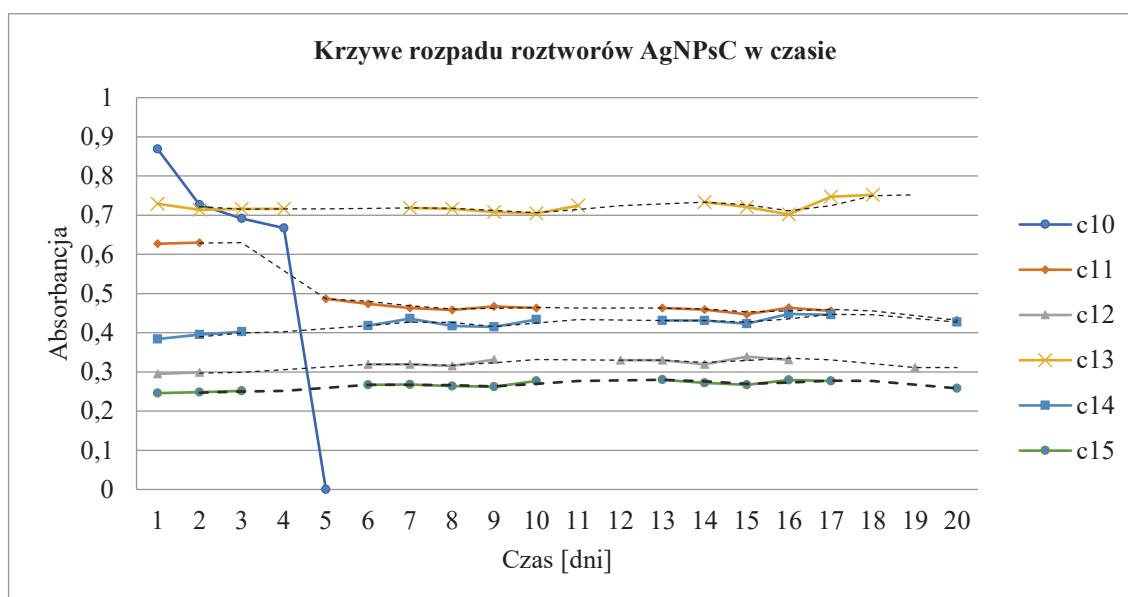
Na szaro zaznaczono roztwory użyte do dalszych badań

Tabela 4. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi.

Na podstawie codziennych pomiarów spektrofotometrycznych stworzono krzywe rozpadu dla NPs wykazujących trwałość przez 24h, co przedstawiono w tabeli 5 i dołączonym do tabeli wykresie 10. Roztwór C10 charakteryzował się wysokim tempem agregacji. Przez cztery kolejne dni od zakończenia procesu syntezy odnotowywano zmniejszenie wartości absorbancji w roztworze C10 od ok. 0,9 do ok. 0,7. Natomiast piątego dnia pomiar spektrofotometryczny nie był możliwy z uwagi na całkowitą agregację AgNPs, widoczną również makroskopowo. Stopniową agregację wykazywał również roztwór C11 (w ciągu pięciu dni absorbancja zmniejszyła się od ponad 0,6 do poniżej 0,5), jednakże po kilku dniach doszło do ustalenia równowagi w roztworze i uzyskania stabilności kinetycznej roztworu (absorbancja roztworu oscylowała wokół wartości 0,45). W roztworach C12, C13, C14, i C15 nie obserwowano znaczących zmian absorbancji, co świadczy o trwałości roztworów w czasie trwania eksperymentu.

AgNPs	Dzień syntezy		7 dni po zakończeniu syntezy		14 dni po zakończeniu syntezy	
	λ_{max} [nm]	Ab _{max}	λ_{max} [nm]	Ab _{max}	λ_{max} [nm]	Ab _{max}
C10	397	0,869	-	-	-	-
C11	398	0,627	396	0,463	397	0,459
C12	412	0,298	412,5	0,315	414	0,339
C13	412	0,729	414,5	0,719	414,5	0,733
C14	416	0,388	415,5	0,417	415,5	0,423
C15	394	0,245	393	0,268	396	0,272

Tabela 5. Zmiana absorbancji w czasie dla poszczególnych rodzajów AgNPsC.



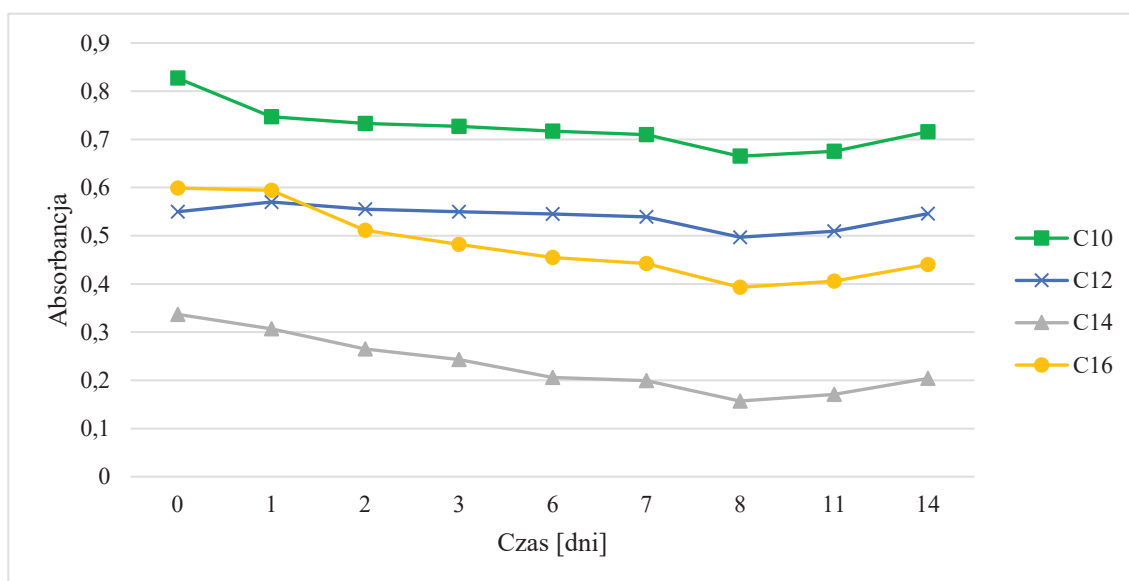
Wykres 10. Krzywe rozpadu wyrysowane na podstawie absorbancji mierzonej w czasie 20 dni. Przerwaną linią zaznaczono ekstrapolacje danych na dni w których pomiary nie były wykonywane.

4.2.1.3 AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego

W przypadku AgNPsB punkty max absorbancji wykazują nieznaczne różnice, co świadczy o dużej stabilności kinetycznej roztworów w czasie trwania eksperymentu. Poszczególne roztwory AgNPs charakteryzują niewielkie zmiany długości fali w czasie 14 dni, oznacza to że AgNPs mają stały rozmiar. Pomiary absorbancji i długości fal przedstawiono w tabeli 6, a krzywe rozpadu pokazano na wykresie 11. Podsumowanie powyższych analiz przedstawiono w tabeli 7.

AgNPs	Dzień syntezy		7 dni po zakończeniu syntezy		14 dni po zakończeniu syntezy	
	λ_{\max} [nm]	Ab max	λ_{\max} [nm]	Ab max	λ_{\max} [nm]	Ab max
B10	404	0,749	406	0,71	406	0,717
B12	413	0,57	414	0,54	414	0,547
B14	415	0,307	417	0,201	418	0,206
B16	420	0,594	423	0,443	423	0,442

Tabela 6. Zmiana absorbancji w czasie dla poszczególnych rodzajów AgNPsB.



Wykres 11. Krzywe rozpadu wyznaczone na podstawie pomiarów absorbancji roztworów w czasie dla AgNPsB.

Numer	AgNPs opłaszczony estrami kwasu bursztynowego	Skrótowa nazwa	Trwałość AgNPs 24h po zakończeniu syntezy	Trwałość AgNPs po 7 dniach od zakończenia syntezy	Trwałość AgNPs po 14 dniach od zakończenia syntezy
1	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₀ H ₂₁	B10AgNPs	+	+	+
2	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₁ H ₂₃	B11AgNPs	+	+	+
3	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₂ H ₂₅	B12AgNPs	+	+	+
4	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₃ H ₂₇	B13AgNPs	+	+	+
5	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₄ H ₂₉	B14AgNPs	+	+	+
6	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₅ H ₃₁	B15AgNPs	+	+	+
7	COOH-(CH ₂) ₂ -COO-C ₁₆ H ₃₃	B16AgNPs	+	+	+

Tabela 7. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPsB.

4.2.2 Ocena siły działania przeciwegronkowcowego w czasie (trwałość mikrobiologiczna)

Stopniowa agregacja AgNPs może wpływać na utratę działania biologicznego. Nie jest wiadomym czy stabilność kinetyczna AgNPs w prosty sposób przekłada się na zachowanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych NPs w czasie. Po raz pierwszy postanowiono zweryfikować tą hipotezę przeprowadzając badania mikrobiologiczne

na zsyntezowanych roztworach AgNPs wykonując oznaczenia MIC metodą seryjnych rozcieńczeń w odstępach czasu.

W przypadku AgNPs oznaczenia wykonywano w odstępach dwu tygodniowych, przy czym „0 tydzień” oznacza, że trzy dni po zakończeniu procesu syntezy i dializy rozpoczęto wykonywanie testów mikrobiologicznych (test trwa 3 dni), „2 tyg” oznacza że po dwóch tygodniach od rozpoczęcia poprzedniego testu mikrobiologicznego rozpoczęto drugi test. Testy trwałości dla roztworów AgNPsPVP i AgNPsC wykonano w odstępach dwutygodniowych, a w przypadku AgNPsB oznaczenia wykonano w odstępach 6 miesięcznych.

Wykazano, iż w przypadku AgNPs opłaszczanych: PVP 3,5, PVP 10, PVP 25 i PVP 40 aktywność przeciwegronkowcowa (wyrażona jako średnia wartość MIC dla sześciu szczepów *S. aureus*) spada istotnie statystycznie w ciągu czterech tygodni od zakończenia procesu syntezy. Tylko wobec PVP 55 nie wykazano istotnego statystycznie spadku aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co oznacza że tylko ten rodzaj AgNPs utrzymują swoją aktywność w czasie 4 tygodni.

Większą zdolnością do zachowania aktywności przeciwegronkowcowej w czasie charakteryzowały się AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi. Cztery z sześciu badanych rodzajów AgNPsC utrzymywały stałą siłę działania przez 4 tyg. (nie wykazano istotnego statystycznie spadku wartości MIC). Roztwory AgNPs C12 i C15 utraciły aktywność w czasie, przy czym dla C12 p val. wynosiła 0.04, a więc wartość zbliżoną do punktu odcięcia wynoszącego 0.05. Wyniki analiz statystycznych przedstawiono w tabeli 8.

Rodzaj AgNPs	0 tydz / 2 tydz				0 tydz / 4 tydz			
	Ś. MIC 0 tydz	Ś. MIC 2 tydz	p val.	Istotność statyst.	Ś. MIC 0 tydz	Ś. MIC 4 tydz	p val.	Istotność statyst.
PVP 3.5	227,56	337,78	0,05	+	227,56	384,00	0,004	+
PVP 10	328,89	391,11	0,20	+	328,89	426,67	0,009	+
PVP 25	257,78	405,33	0,01	+	257,78	419,56	0,008	+
PVP 40	320,00	348,44	0,27	-	320,00	419,56	0,040	+
PVP 55	176,89	187,56	0,78	-	176,89	234,67	0,076	-
C 10	483,56	469,33	1,00	-	483,56	512,00	0,35	-
C 11	355,56	337,78	0,20	-	355,56	362,67	0,883	-
C 12	49,33	44,00	0,37	-	49,33	66,67	0,040	+
C 13	54,22	56,89	0,45	-	54,22	90,67	0,088	-
C 14	23,56	22,22	0,87	-	23,56	21,33	0,784	-
C 15	47,11	57,78	0,43	-	47,11	177,78	0,001	+

Tabela 8. Porównanie średnich wartości MIC dla 6 szczepów gronkowca złocistego (Ś. MIC) wykonywane od razu po zakończeniu syntezy (0 tydz.), 2 i 4 tyg od zakończenia syntezy (2 tydz i 4 tydz.). Istotna statystycznie różnica w aktywności oznacza utratę aktywności przeciwostronkowcowej.

W trakcie badań wstępnych zaobserwowano, że AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego są wysoce aktywne nawet kilka miesięcy po zakończeniu procesu syntezy. Zbadano więc aktywność poszczególnych roztworów po 3 i 6 miesiącach. Na poziomie istotności statystycznej 95% wykazano że wszystkie AgNPsB utrzymują swoją aktywność przeciwostronkowcową przez 12 tyg. Po 24 tygodniach tylko roztwór B 16 okazał się być trwały. Wyniki analizy statystycznej pokazano w tabeli 9.

Rodzaj AgNPs								
	Ś. MIC 0 tydz.	Ś. MIC 2 tydz.	p val.	Istotność statyst.	Ś. MIC 0 tydz.	Ś. MIC 4 tydz.	p val.	Istotność statyst.
B 10	42,67	48,9	0,4	-	42,7	88,9	0,004	+
B 12	25,78	26,7	0,9	-	25,8	39,1	0,02	+
B 14	12,44	11,3	0,4	-	12,4	20,4	0,01	+
B 16	16,89	17,8	0,8	-	16,9	21,8	0,07	-

Tabela 9. Porównanie średnich wartości MIC dla 6 szczepów gronkowca złocistego (Ś. MIC) wykonywane od razu po zakończeniu syntezy (0 tydz.), 12 i 24 tyg. od zakończenia syntezy (12 tydz i 24 tydz.). Istotna statystycznie różnica w aktywności oznacza utratę aktywności przeciwostronkowcowej.

Szczegółowe wyniki testów mikrobiologicznych z rozdzieleniem na poszczególne szczepy *S. aureus* przedstawiono i omówiono w poszczególnych podrozdziałach.

4.2.2.1 Działanie przeciwostronkowcowe w czasie dla AgNPs opłaszczanych PVP

Stabilność mikrobiologiczna dla roztworu PVP 40 była największa, gdyż przez okres 4 tygodni dla wszystkich badanych szczepów nie wykazano różnic w zastosowanych stężeniach badanego roztworu większych niż jeden rząd wielkości (tj. 512ppm i 256ppm). W przypadku PVP 3,5 zmniejszenie siły działania zaobserwowano dla 2 szczepów: 002W oraz 6538, odpowiednio o 4 i 5 rzędów wielkości wartości MIC. O trzy rzędy wielkości zmniejszyła się wartość MIC dla PVP 25 (szczepy 25923 i 6538). W przypadku PVP 10 działanie przeciwbakteryjne zmniejszyło się wobec szczepu 6538, a różnica wynosiła trzy rzędy wielkości. Opłaszczanie AgNPs przez PVP o ciężarze 55 kDa miało najbardziej niekorzystny wpływ na utrzymanie siły działania przeciwegronkowcowego gdyż dla 5 z 6 szczepów wykazano zwiększenie MIC w czasie 4 tygodni trwania eksperymentu. Poszczególne wartości MIC przedstawiono w tabeli 10.

		Nazwa szczepu <i>S. aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	512	64	512	64	128	32
	2	512	64	512	64	512	512
	4	512	512	512	128	256	512
PVP 10							
		Nazwa szczepu <i>S. aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	256	512	512	128	512	64
	2	256	>512	512	128	512	512
	4	>512	512	512	256	512	256
PVP 25							
		Nazwa szczepu <i>S. aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	256	512	256	32	512	64
	2	512	512	256	128	512	512
	4	256	512	>512	256	512	512
PVP 40							
		Nazwa szczepu <i>S. aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	256	512	256	128	256	512
	2	256	512	256	128	256	512
	4	>512	512	512	128	512	512
PVP 55							
		Nazwa szczepu <i>S. aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	32	16	16	16	32	16
	2	256	256	256	16	256	64
	4	256	256	256	16	256	64
MIC [ppm]							

Tabela 10. Wartości MIC dla każdego rodzaju AgNPsPVP i dla poszczególnych szczepów *S. aureus* wykonywane w odstępach dwutygodniowych.

4.2.2.2 Działanie przeciwgronkowcowe w czasie dla AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi

Roztwory AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykazywały większą niż opłaszczane PVP trwałość mikrobiologiczną gdyż dla dwóch rodzajów nanocząstek nie odnotowano mikrobiologicznie istotnej utraty siły działania przeciwgronkowcowego (C11 i C14). W przypadku C 12, C13 zwiększenie MIC odnotowano dla pojedynczych szczepów, odpowiednio 6538 oraz 006W. Najmniej stabilny mikrobiologicznie okazał się być roztwór C15, zwiększenie MIC w czasie odnotowano dla 3 szczepów klinicznych

i jednego referencyjnego (001W, 002W, 006W i 6538). Wyniki MIC dla AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi przedstawiono w tabeli 11.

C 11							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	512	256	512	64	512	256
	2	512	128	512	128	512	256
	4	256	256	512	128	512	512
C 12							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	128	32	64	16	32	8
	2	128	32	64	16	32	16
	4	128	32	128	16	32	64
C 13							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	128	32	32	16	32	32
	2	128	32	32	32	64	64
	4	128	32	256	32	64	32
C 14							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	32	16	16	16	32	16
	2	16	16	16	32	16	32
	4	32	16	32	16	16	16
C 15							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	64	64	64	64	32	32
	2	32	64	64	64	32	128
	4	256	256	256	64	32	128
MIC [ppm]							

Tabela 11. Wartości MIC dla AgNPs C dla poszczególnych szczepów *S. aureus* wykonywane w odstępach dwutygodniowych.

4.2.2.3 Działanie przeciwgronkowcowe w czasie dla AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego

Największą trwałością z pośród wszystkich badanych rodzajów AgNPs wykazały te opłaszczane estrami kwasu bursztynowego. Testowano siłę działania przeciwoznaczającego tych roztworów w czasie 6 miesięcy. W badanym okresie odnotowano istotny spadek siły działania przeciwoznaczającego dla B10 wobec szczepu 25923 i 12598. W przypadku pozostałych 3 roztworów AgNPs nie wykazano istotnych zmian. Wyniki MIC dla AgNPsB przedstawiono w tabeli 12. Warto zwrócić jednak uwagę, że analiza statystyczna, wykazała tylko utrzymanie trwałości roztworu przez 3 tyg. Można to wytłumaczyć faktem, że do testów statystycznych użyto średnich wartości MIC (ujmując wszystkie powtórzenia), a nie jak w przypadku prezentowanych poniżej danych wartości MIC powtarzającej się przynajmniej dwukrotnie.

B 10							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	32	64	64	32	32	32
	12	64	32	64	64	32	32
	24	64	128	64	128	128	32
B 12							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	16	16	32	16	32	32
	12	16	32	32	16	32	32
	24	32	32	64	64	16	32
B 14							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	16	16	16	8	8	8
	12	16	16	16	8	8	8
	24	16	16	32	16	16	16
B 16							
		Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
		001W	002W	006W	25923	12598	6538
Czas [tydzień]	0	16	16	16	16	16	8
	12	16	16	16	16	16	16
	24	16	32	16	32	16	32
MIC [ppm]							

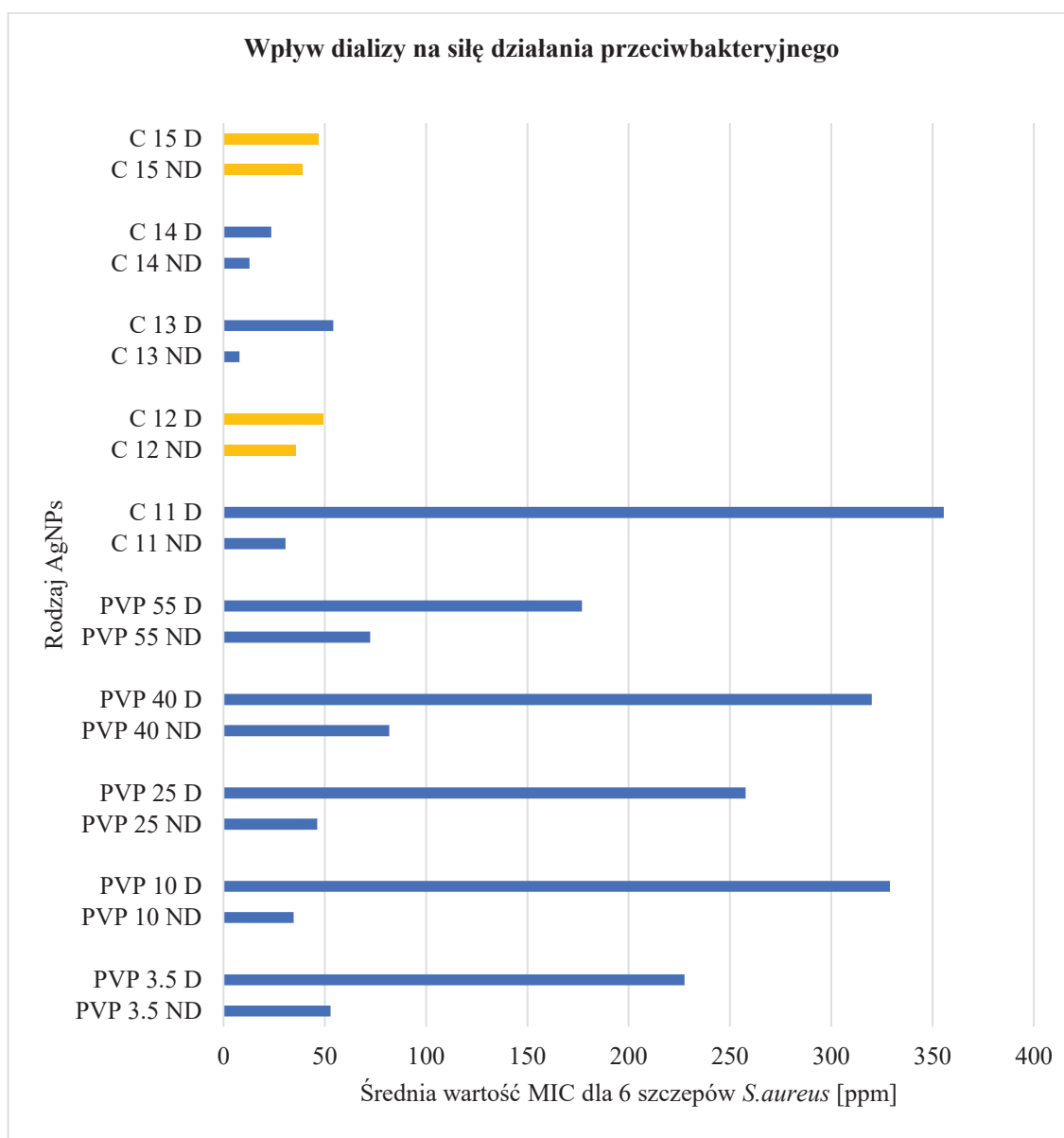
Tabela 12. Wartości MIC dla AgNPs B i dla poszczególnych szczepów *S. aureus* wykonywane w odstępach dwutygodniowych.

4.3 Wpływ oczyszczania za pomocą dializy na aktywność przeciwdrobnoustrojową NPs

Oczyszczanie mieszaniny poreakcyjnej jest koniecznym procesem, zwiększającym prawdopodobieństwo otrzymania obiektywnych wyników testów fizykochemicznych i biologicznych. Dializa jest metodą szybką, nisko kosztową i możliwą do stosowania dla dużych objętości roztworów. Do oceny czy oczyszczanie za pomocą dializy jest skutecznym sposobem na usunięcie z roztworu innych cząsteczek mających działanie przeciwdrobnoustrojowe użyto tylko dwóch grup roztworów AgNPs: AgNPsPVP i AgNPsC, jako że te dwie grupy związków zsyntezowano w pierwszym etapie badań, wtedy też postanowiono sprawdzić wpływ dializy na siłę działania przeciwdrobnoustrojowego, żeby zapobiec zafałszowaniu wyników badań poprzez zanieczyszczenia obecne w mieszaninie poreakcyjnej.

Sprawdzano wartości MIC roztworów AgNPs poddanych procesowi dializy (AgNPsD) po syntezy oraz mieszaniny poreakcyjnej AgNPs (AgNPsND). Różnice w wartościach MIC pokazano na wykresie 12. Im niższa wartość MIC tym silniej bakteriostatycznie działają poszczególne roztwory AgNPs. Na niebiesko zaznaczono istotną statystycznie różnicę w sile działania przeciwdrobnoustrojowego, na pomarańczowo brak różnic. W przypadku wszystkich rodzajów AgNPsPVP udowodniono z istotnością na poziomie $p < 0.05$, że istnieje różnica w sile działania pomiędzy AgNPs dializowanymi i niedializowanymi. W przypadku roztworów C12 i C15, nie wykazano takiej zależności. Warto zwrócić także uwagę, że większą siłą działania przeciwdrobnoustrojowego charakteryzowały się roztwory nie oczyszczane, co świadczy o tym, że zanieczyszczenia istniejące w mieszaninie poreakcyjnej wykazują działanie biologiczne.

Na podstawie przeprowadzonych testów wykazano, że dializa jest skutecznym sposobem oczyszczania nanocząstek z substancji mogących mieć działanie przeciwdrobnoustrojowe. Szczegółowe dane dotyczące poszczególnych szczepów przedstawiono w podrozdziałach.



Wykres 12. Różnice w średnich wartościach MIC pomiędzy AgNPs oczyszczanymi i nieoczyszczanymi.

4.3.1 AgNPs opłaszczane PVP

W tabeli 13 zestawiono wartości MIC dla AgNPs w formie oczyszczonej i nieoczyszczonej opłaszczanych PVP. Różnice MIC o pięć rzędów wielkości wykazano dla PVP 24 i szczepu 12598. Dla czterech prób stwierdzono różnice czterech rzędów wielkości (PVP 10 szczep: 002W, 006W i 12598 oraz dla PVP 25 szczep 002W). Trzy rzędy wielkości dla siedmiu prób (PVP 3,5 szczep: 001W i 006W, 25923; PVP 10 szczep: 001W, 25923; PVP 40 szczep: 002W, 6538). Dwa rzędy wielkości dla dziewięciu prób (PVP 25 szczep: 001W, 006W; PVP40 szczep: 001W, 006W, 25923; PVP55 szczep: 001W, 006W, 12598). Jeden rząd wielkości dla 6 prób (PVP 3,5

szczy: 12598, 6538; PVP 25 szczep 6538; PVP 55 szczepy: 002W, 25923, 6538). Nie wykazano różnic dla czterech prób (PVP 3,5 szczep 002W; PVP 10 szczep: 6538; PVP 25 szczep 25923; PVP 40 szczep: 12598).

Rodzaj NPs	Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
	001W	002W	006W	25923	12598	6538
PVP 3,5 D	512	64	512	64	128	32
PVP 3,5 ND	64	64	64	8	64	64
PVP 10 D	256	512	512	128	512	64
PVP 10 ND	32	32	32	16	32	64
PVP 25 D	256	512	256	32	512	64
PVP 25 ND	64	32	64	32	16	32
PVP 40 D	256	512	256	128	256	512
PVP 40 ND	64	64	64	32	256	64
PVP 55 D	256	256	256	16	256	64
PVP 55 ND	64	128	64	8	64	128

Tabela 13. Różnice w wartościach MIC dla poszczególnych rodzajów AgNPs PVP w formie dializowanej i niedializowanej

4.3.2 AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi

W tabeli 14 Przedstawiono wartości MIC dla AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi w formie oczyszczonej i nieoczyszczonej. W przypadku AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi największe różnice w wartościach MIC wynoszące pięć rzędów wielkości odnotowano dla 2 prób (C11 szczepy: 12598 i 6538). Różnica czterech rzędów wielkości wystąpiła w 1 przypadku (C11 i szczep 006W). Różnicę trzech rzędów wielkości stwierdzono dla 5 prób (C11 szczepy: 001W i 002W; C13 001W, 2593, 6538). Wartości MIC różniły się o dwa rzędy wielkości dla 6 prób (C13 szczepy: 002W, 006W, 12598; C14 szczep 25923; C15 szczepy: 002W i 25923). Różnice nieistotne stwierdzono dla 15 prób, jeden rząd wielkości dla 7 prób (C11 szczep 25923; C12 szczepy: 001W, 12598, 6538; C14 szczepy: 12598 i 6538; C15 szczep 12598), a -u różnic - 8 prób (C12 szczepy: 002W, 006W, 25923; C14 szczepy: 001W, 002W; C15 szczepy: 001W, 006W, 6538).

Rodzaj NPs	Nazwa szczepu <i>S.aureus</i>					
	001W	002W	006W	25923	12598	6538
C10 D	512	512	512	256	512	512
C10 ND	>512	>512	>512	256	>512	>512
C11 D	512	256	512	64	512	256
C11 ND	64	32	32	32	16	8
C12 D	128	32	64	16	32	8
C12 ND	64	32	64	16	16	4
C13 D	128	32	32	16	32	32
C13 ND	16	8	8	2	8	4
C14 D	32	16	16	16	32	16
C14 ND	32	16	8	4	16	8
C15 D	64	64	64	64	32	32
C15 ND	64	16	64	16	64	32

Tabela 14. Różnice w wartościach MIC dla poszczególnych rodzajów AgNPs C w formie dializowanej i niedializowanej.

4.4 Badania nad wpływem substancji oplaszczającej na morfologię i działanie przeciwwronkowcowe AgNPs.

Przeprowadzono testy mikrobiologiczne oraz serię analiz fizykochemicznych dla poszczególnych roztworów AgNPs. Po raz pierwszy przeprowadzono systematyczne badania pokazujące wpływ stopniowego wydłużania łańcucha karboksylowego w cząsteczce stabilizatora na wygląd otrzymywanych AgNPs oraz ich działanie biologiczne.

4.4.1 Ocena działania przeciwwronkowcowego AgNPs w zależności od rodzaju stabilizatora

Do wykonania testów wrażliwości *S. aureus* wobec AgNPs użyto sześciu szczepów, które w pierwszej kolejności scharakteryzowano pod kątem wrażliwości na antybiotyki, jako że są to substancje szeroko stosowane w medycynie i służą do wykonania charakterystyki fenotypowej szczepów. W kolejnym etapie wykonano oznaczenia MIC dla AgNO₃, który jest preparatem srebra używanym w codziennej praktyce lekarskiej w stężeniach od 1% (zabieg Crede'go) do nawet 40% (roztwór kauteryzujący tkanki). Do testów użyto stężeń takich samych jak stosowano wobec roztworów AgNPs czyli od 0.001 do 0.1% (0,1% - 100 µg/ml – 100ppm). Ostatnim etapem badań mikrobiologicznych było określenie MIC dla poszczególnych roztworów nanocząstek.

4.4.1.1 Charakterystyka badanych szczepów pod kątem wrażliwości na konwencjonalne antybiotyki

Oporność na konwencjonalne antybiotyki wśród badanych szczepów była zbliżona. Szczepy 001W, 006W oraz 25923 były odporne na ciprofloksacynę. Szczep kliniczny 001W wykazywał ponadto oporność na linezolid, 002W na wankomycynę, a szczep 006W na kwas fusydowy. Wśród szczepów referencyjnych tylko 12598 wykazywał dodatkowo oporność na erytromycynę. Wyniki przedstawiono w tabeli 15.

MIC dla konwencjonalnych antybiotyków [ppm]							Norma EUCAST*
Badana substancja	Szczepy <i>S. aureus</i>						
	001W	002W	006W	25923	12598	6538	
Wankomycyna	2	8	2	2	1	1	>2
Erytromycyna	<1	<1	<1	<1	8	<1	>2
Ampicylina	8	256	2	256	16	8	**
Ciprofloksacyna	8	0.5	64	4	1	1	>1
Mupirocyna	<1	<1	64	<1	<1	<1	>256
Kwas fusydowy	<1	<1	4	<1	<1	<1	>1
Linezolid	>512	<1	<1	<1	<1	<1	>4
Rifampicyna	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	>0,5

* Wartość MIC powyżej której drobnoustroj uważany jest za odporny na badany antybiotyk ²⁶
Na szaro zaznaczono oporność na antybiotyk
** EUCAST nie podaje interpretacji wyniku

Tabela 15. Oporność badanych szczepów *S. aureus* na konwencjonalne antybiotyki.

4.4.1.2 Charakterystyka badanych szczepów pod kątem wrażliwości na AgNO₃

Wrażliwość drobnoustrojów na AgNO₃ była niewielka. MIC dla większości szczepów wynosiły 512 ppm. Tylko dla dwóch szczepów (006W oraz 6538) wynosiły 256 ppm. Wyniki przedstawiono w tabeli 16.

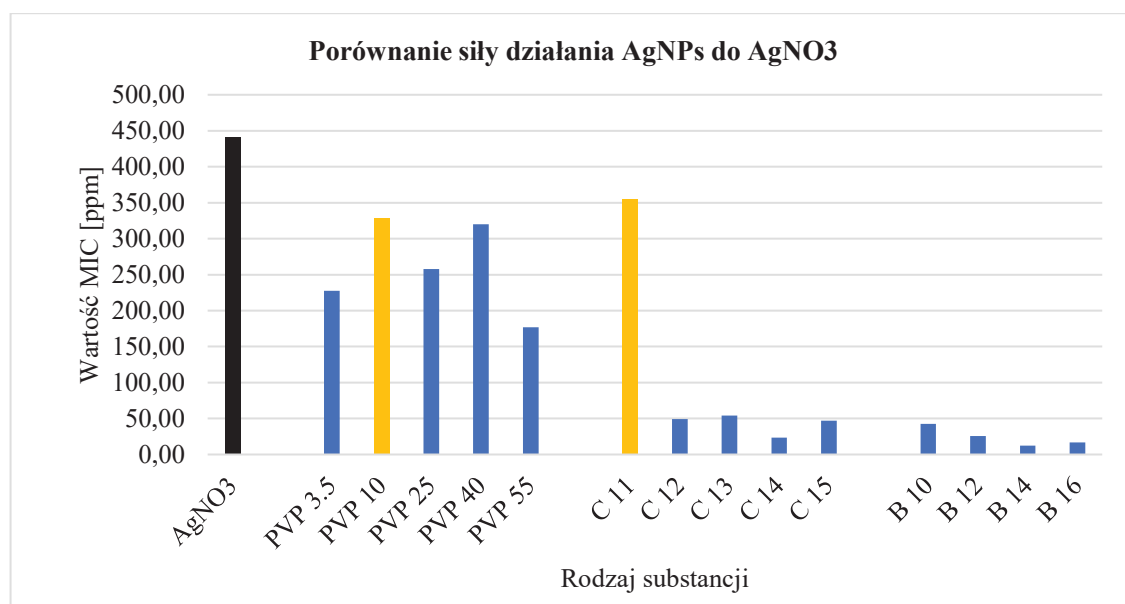
Szczep <i>S.aureus</i>						
Badana substancja	001W	002W	006W	25923	12898	6538
AgNO ₃	512	512	256	512	512	256

Tabela 16. Wyniki MIC dla AgNO₃.

4.4.1.3 Wpływ substancji opłaszczającej na aktywność przeciwdrobnoustrojową NPs

Po raz pierwszy przeprowadzono systematyczne testy mikrobiologiczne nad wpływem stabilizatora na działanie biologiczne AgNPs. Przeprowadzone testy wykazały, że rodzaj substancji opłaszczającej wpływa na siłę działania przeciwdrobnoustrojowego. Poniżej (wykres 13) przedstawiono wyniki porównania siły działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs odniesione do siły działania azotanu srebra, jako substancji referencyjnej. Tylko wobec C11 oraz PVP 10 nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w działaniu pomiędzy AgNPs i AgNO₃ w tych samych stężeniach. Roztwory AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi o liczbie węgli >11

i opłaszczane estrami kwasu bursztynowego działają kilkadziesiąt razy silniej niż AgNO_3 .

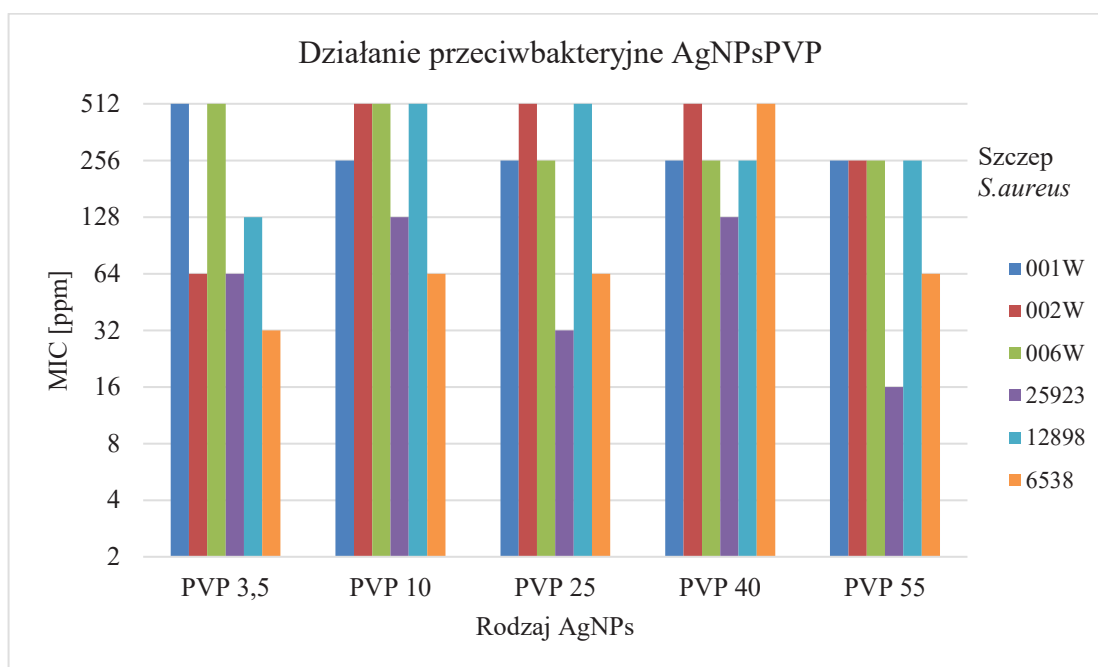


Wykres 13. Porównanie siły działania przeciwwronkowcowego azotanu srebra i poszczególnych rodzajów nanocząstek wraz z uwzględnieniem istotnej statystycznie różnicy w sile działania zaznaczonej na kolor niebieski.

Poniżej przedstawiono szczegółowo wyniki dla każdego rodzaju badanych AgNPs oraz statystyczne porównanie aktywności poszczególnych AgNPs pomiędzy sobą.

AgNPs opłaszczane PVP

Na wykresie 14 przedstawiono wartości MIC wobec 5 rodzajów AgNPsPVP dla 6 szczepów *S. aureus*. AgNPsPVP charakteryzowały się słabym działaniem przeciwwronkowcowym, gdyż dla większości roztworów MIC wynosiły ≥ 64 ppm. Najmniejszą odnotowaną wartością MIC odnotowaną dla 30 prób było 16 ppm (tylko 1 szczep). Najsilniejsze działanie biologiczne wykazywał roztwór PVP 3,5 (dla 3 szczepów MIC < 64 ppm). Najsłabsze działanie bakteriostatyczne wobec *S. aureus* wykazywał roztwór PVP 40, gdyż dla wszystkich szczepów MIC > 128 ppm.

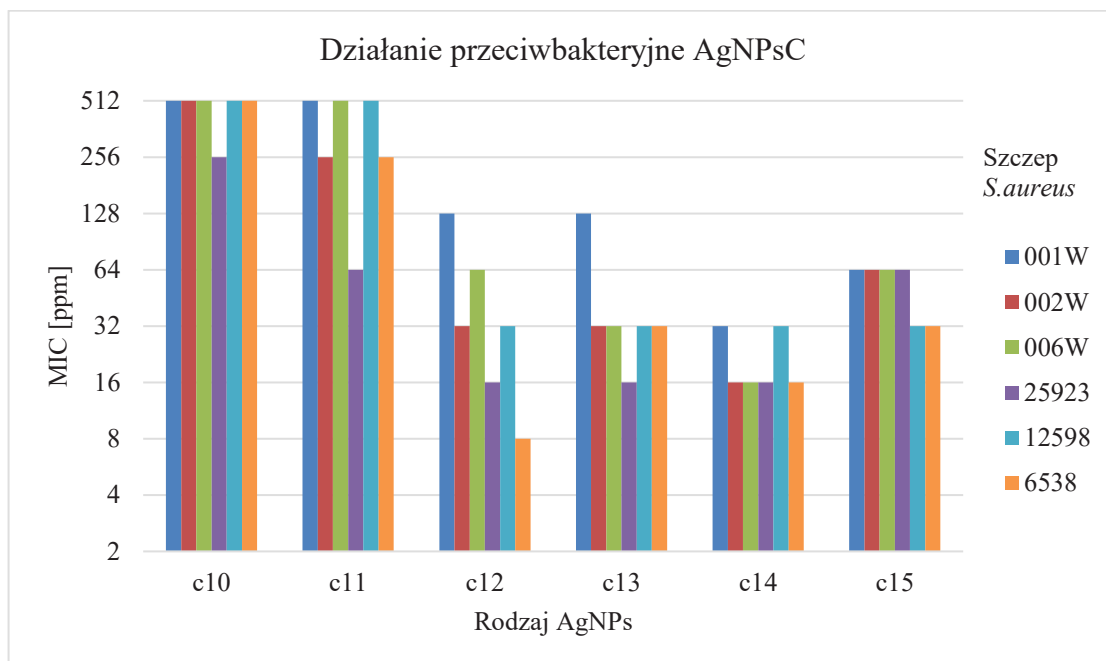


Wykres 14 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach *S. aureus* dla każdego rodzaju AgNPsPVP.

AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi

Wykres 15 przedstawia wartości MIC dla AgNPsC. Na podstawie porównania wykresów 14 i 15 można zauważyć, że kwas AgNPs opłaszczane kwasami karboksylowymi wykazują silniejsze działanie przeciwwgronkowcowe niż te opłaszczane PVP. Najśłabsze działanie wobec szczepów *S. aureus* wykazują roztwory C10 i C11. Wartości MIC dla większości szczepów (oprócz jednego) wynoszą ≥ 256 ppm. Jednakże zwiększenie długości łańcucha o jeden węgiel powoduje znaczne zwieszenie właściwości bakteriostatycznych AgNPs. Dla C12 wartości MIC ≤ 32 ppm wykazano wobec 4 z 6 badanych szczepów. Zwiększenie długości łańcucha o kolejny węgiel nie wpłynęło na istotnie na wartości MIC (MIC ≤ 32 ppm stwierdzono dla 5 z 6 szczepów). Najsilniejsze działanie przeciwwgronkowcowe wykazywał roztwór C14, gdyż MIC wynoszące 16 ppm stwierdzono dla 4 szczepów, a dla pozostałych 2 szczepów MIC wynosiły po 32 ppm. Spadek aktywności przeciwwgronkowcowej odnotowano dla C15 (dla 4 szczepów MIC wynosiły 64 ppm, a dla 2 szczepów - 32 ppm). Jak wcześniej wykazano 16C AgNPs tworzą mieszaninę żelową i uniemożliwiającą dalsze analizy.

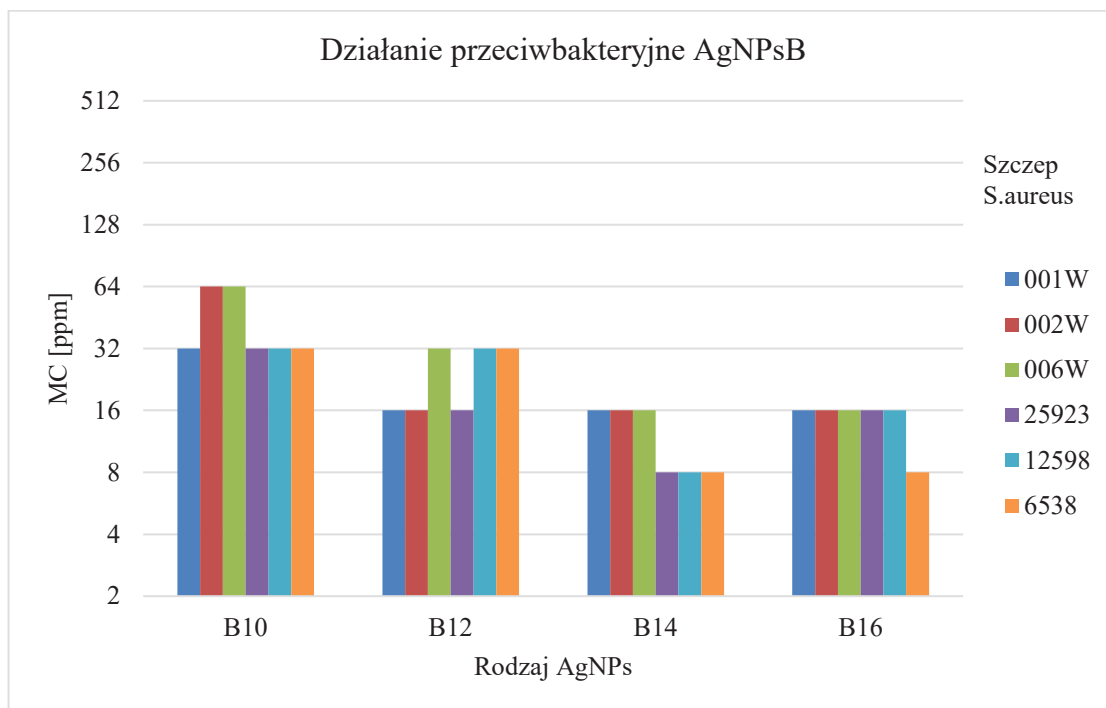
Aktywność przeciwbakteryjna AgNPsC zależy od długości łańcucha węglowego. W przypadku tego rodzaju AgNPs aktywność przeciwwgronkowcową można modulować poprzez zmianę liczby węgli w łańcuchu karboksylowym.



Wykres 15 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach *S. aureus* dla każdego rodzaju AgNPsC.

AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego

Na wykresie 16 przedstawiono wartości MIC wobec 4 rodzajów AgNPsB dla 6 szczepów *S. aureus*. Ten rodzaj AgNPs charakteryzował najsilniejsze działanie przeciwgronkowcowe spośród wszystkich badanych AgNPs, tj. AgNPsPVP i AgNPsC. Amplituda wartości MIC dla czterech rodzajów AgNPs wynosiła 3 rzędy wielkości (od 8 ppm do 64 ppm). Najslabiej wobec szczepów *S. aureus* działał roztwór B10, jako że wartości MIC wobec czterech szczepów wynosiły 32 ppm, a wobec pozostałych dwóch 64 ppm. Najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazywał roztwór B 14 (MIC 16 ppm - 3 szczepy i MIC 8 ppm – 3 szczepy). Roztwory B12 i B14 charakteryzowała podobna siła działania przeciwgronkowcowego wynosząca dla większości szczepów 16 ppm.

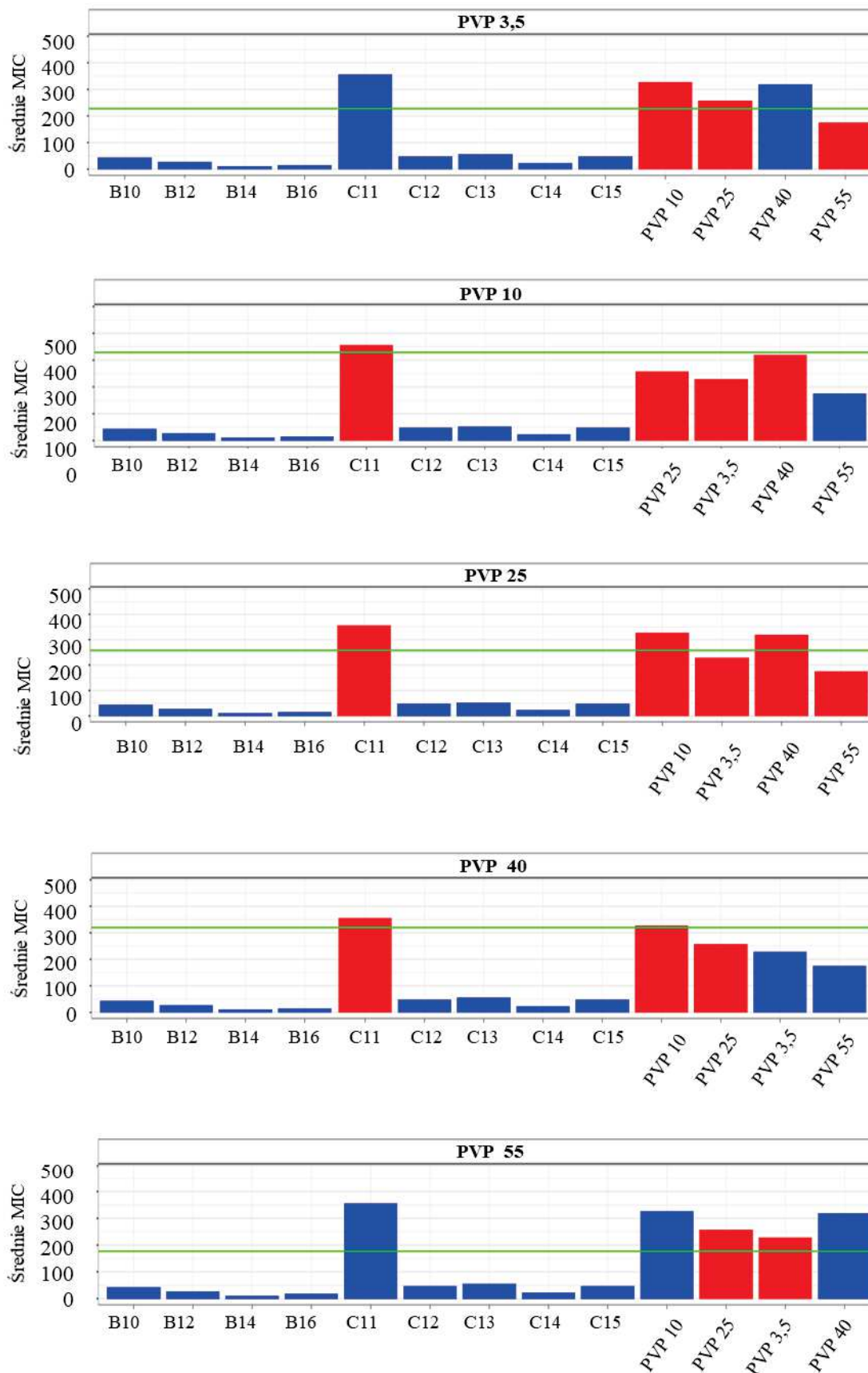


Wykres 16 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach *S. aureus* dla każdego rodzaju AgNPsB.

Porównanie poszczególnych rodzajów AgNPs pomiędzy sobą

Przeprowadzono testy statystyczne porównujące siłę działania przeciwegronkowcowego AgNPs pomiędzy sobą. Słupki pokazują średnie MIC dla danej grupy AgNPs. Na niebiesko zaznaczono te rodzaje AgNPs w stosunku do których porównywany rodzaj wykazywał istotność statystyczną. Zielona linia reprezentuje średnie MIC dla grupy referencyjnej, czyli tego rodzaju AgNPs z którym porównywane były poszczególne grupy (rodzaj AgNPs umieszczony w tytule sub-wykresu). Dla przykładu, w pierwszym wykresie badamy czy siła działania AgNPsPVP 3,5 różni się od pozostałych AgNPs z grupy PVP, C i B. Linia reprezentuje średni MIC dla PVP 3,5. Słabsze działanie niż PVP 3,5 wykazują C11, PVP 10, PVP 25 i PVP 40, przy czym tylko C11 i PVP 40 działają istotnie statystycznie słabiej.

Analizując wykres 17 można więc stwierdzić, że wszystkie rodzaje AgNPsPVP wykazują słabsze działanie przeciwegronkowcowe niż AgNPsC i AgNPsB. Pozatym PVP 3,5 działają istotnie statystycznie słabiej niż PVP 40; PVP 10 wykazują istotnie statystycznie słabsze działanie niż PVP 55; PVP 40 działają istotnie statystycznie słabiej niż PVP 3,5 i PVP 55. Nie wykazano różnic w działaniu PVP 25 w porównaniu do pozostałych rodzajów AgNPs. PVP 55 okazały się wykazywać najsilniejsze działanie przeciwegronkowcowe z całej grupy i w porównaniu do PVP 10 i PVP 40 wykazano istotnie statystycznie większą siłę.



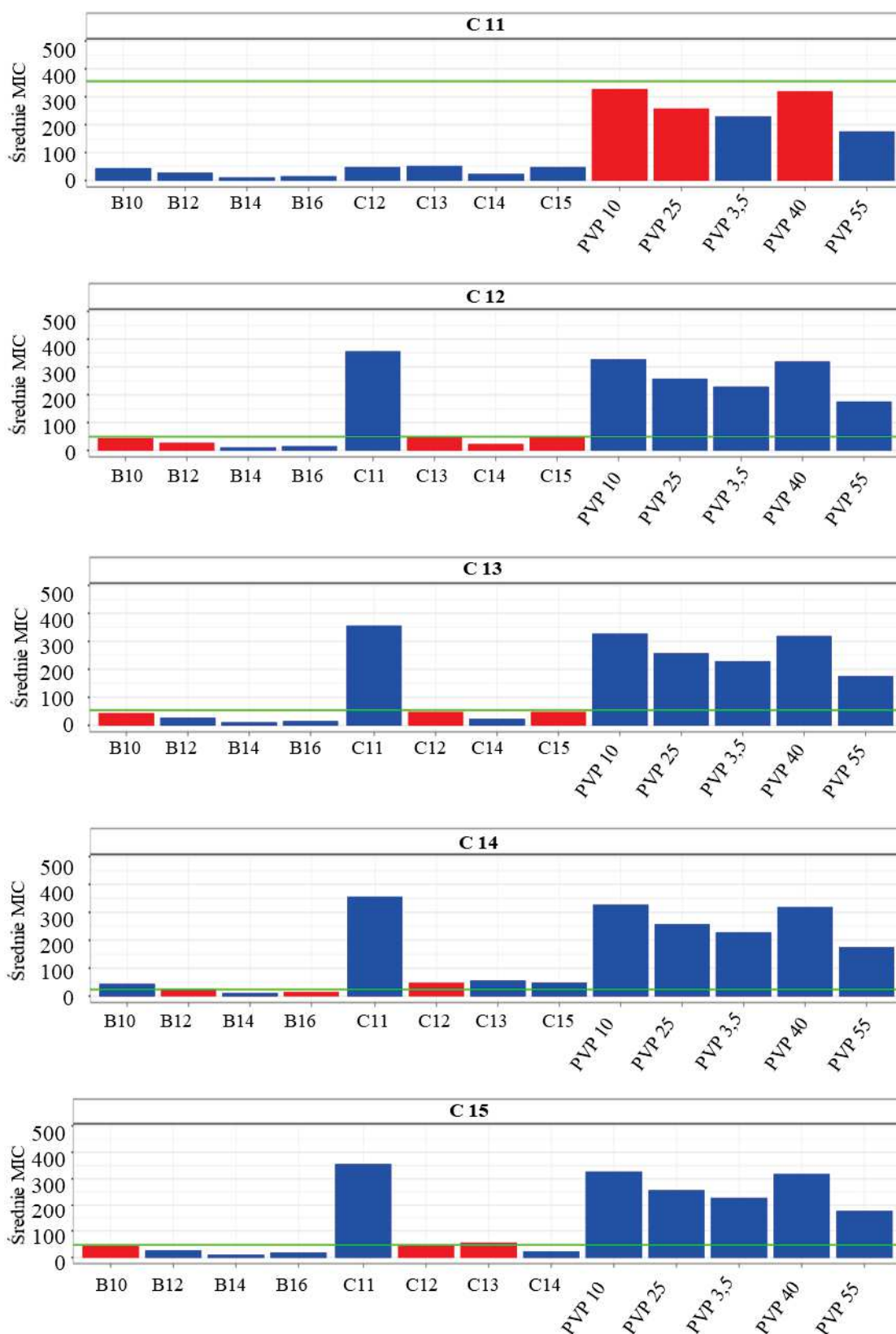
Wykres 17. Porównanie siły działania przeciwegronkowcowego grupy AgNPs PVP pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p > 0.05$.

Grupa AgNPsC w przeciwieństwie do AgNPsPVP wykazuje się większą skutecznością wobec szczepów *S.aureus*. Tylko C11 działają na poziomie AgNPsPVP i aż w przypadku trzech rodzajów PVP nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w sile działania (PVP10, PVP25, PVP40). Natomiast wszystkie rodzaje AgNPsC z wyjątkiem C14 działają słabiej niż grupa AgNPsB.

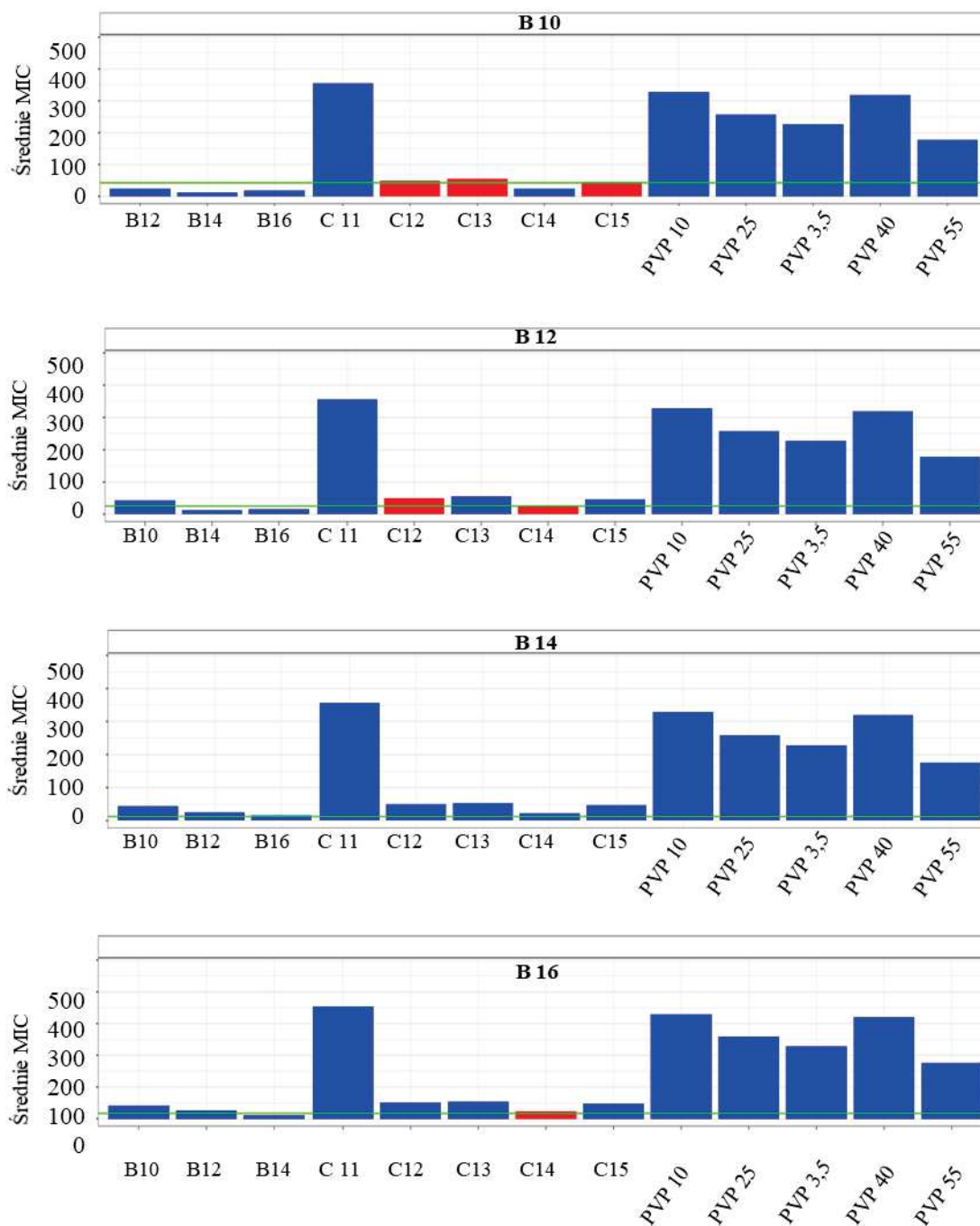
AgNPsC charakteryzuje również duża zmienność wewnątrzgrupowa. C11 działa istotnie statystycznie słabiej od pozostałych AgNPsC. Porównanie siły C12 z C13, C14 i C15 nie wykazało istotnych statystycznie różnic. C 13 działa istotnie silniej przeciwgronkowco niż C11, natomiast słabiej niż C14. C14 jest najskuteczniejszą substancją przeciwbakteryjną w całej grupie, a siła działania C15 jest na poziomie C13. Wyniki analizy statystycznej potwierdziły, że zmiana ilości węgla w łańcuchu karboksylowym istotnie wpływa na siłę działania przeciwgronkowcowego. Powyższe wyniki ilustruje wykres 18.

Najsilniej działającą przeciwgronkowco grupą okazały się być AgNPsB. Średnie wartości MIC wobec każdej z substancji nie były większe niż 42 ppm.

W przypadku tego rodzaju AgNPs również występowały duże różnice wewnątrzgrupowe. W miarę zwiększania ilości węgla w łańcuchu alkoholu siła działania zwiększała się i tak: B10 wykazywały się istotnie statystycznie najsłabszą siłą działania (średni MIC 42ppm), a B16 działały najsilniej (średni MIC 16,9 ppm). Wyniki przedstawia wykres 19.



Wykres 18. Porównanie siły działania przeciwegronkowcowej grupy AgNPs C pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p > 0.05$.



Wykres 19. Porównanie siły działania przeciwwronkowcowego grupy AgNPs B pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p > 0.05$.

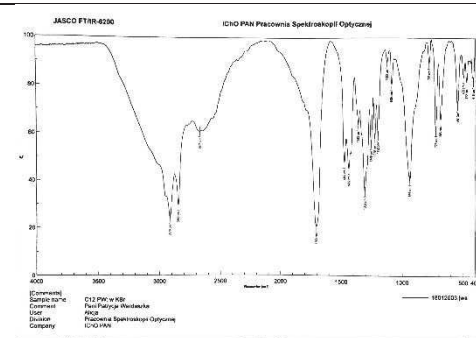
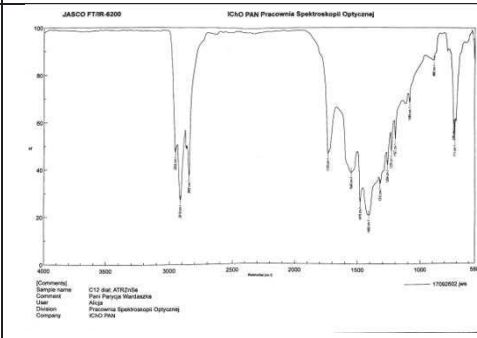
4.4.2 Badania fizykochemiczne

Badania fizykochemiczne przeprowadzono tylko dla AgNPs charakteryzujących się największą siłą działania przeciwwronkowcowego tj. AgNPsC i AgNPsB, z uwagi na

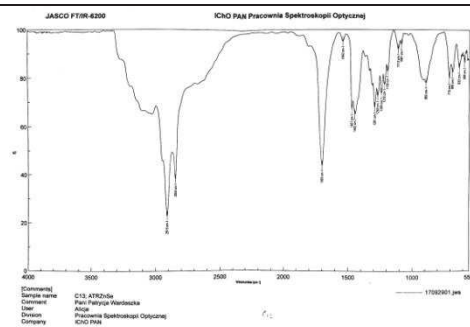
wysoki koszt poniższych badań. Wyniki badań pozwoliły na określenie morfologii AgNPs ze szczególnym uwzględnieniem budowy powierzchni NPs.

4.4.2.1 Spektroskopia IR

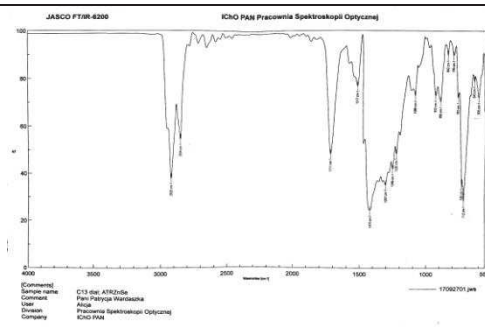
Wykonano serie pomiarów spektroskopowych w świetle podczerwonym. Pomiary nie były możliwe do wykonania dla NPs C11 i opłaszczającego ją kwasu karboksylowego. Po opłaszczaniu AgNPs kwasem dwunastowęglowym w strukturze C12 pojawiły się dimery kwasów karboksylowych. W przypadku C13, C14 i C15 w strukturze stabilizatora pojawiło się wiązanie nienasycone oraz część kwasów opłaszczających AgNPs utworzyło dimery. Warto zwrócić uwagę iż stabilizator nie uległ przemianom w procesie syntezy AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego B10, B12, B14 i B16. Poszczególne widma IR oraz odczytane z tabeli chemicznych informacji o znaczeniu drgań przedstawiono w tabeli 17. Sposób analizy krzywych opisano w podrozdziale 3.2.4.

	Spektrum IR dla stabilizatora	Spektrum IR dla AgNPs opłaszczonej stabilizatorem																		
C11	Pomiar niemożliwy do wykonania	Pomiar niemożliwy do wykonania																		
C12	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1700</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> <tr> <td>2671</td> <td>Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)</td> </tr> <tr> <td>2850</td> <td>Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)</td> </tr> <tr> <td>2919</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1700	Kwas karboksylowy C=O	2671	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)	2850	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)	2919	Kwas karboksylowy C=O	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1405</td> <td>Sygnal dla dimerów kwasów karboksylowych</td> </tr> <tr> <td>1725</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> <tr> <td>2919</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1405	Sygnal dla dimerów kwasów karboksylowych	1725	Kwas karboksylowy C=O	2919	Kwas karboksylowy C=O
Częstość	Przyporządkowanie drgań																			
1700	Kwas karboksylowy C=O																			
2671	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)																			
2850	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)																			
2919	Kwas karboksylowy C=O																			
Częstość	Przyporządkowanie drgań																			
1405	Sygnal dla dimerów kwasów karboksylowych																			
1725	Kwas karboksylowy C=O																			
2919	Kwas karboksylowy C=O																			

C13

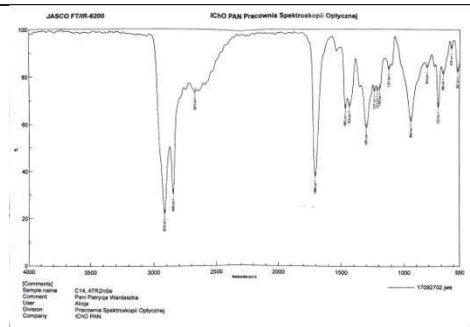


Częstość	Przyporządkowanie drgań
1693	Kwas karboksylowy C=O
2850	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)

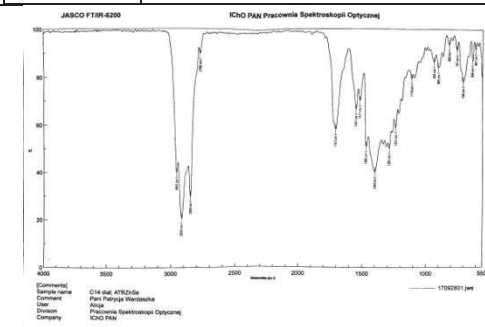


Częstość	Przyporządkowanie drgań
712	Sygnal od drgań wahadlowych CH2 -(CH2)n- dla n większego od 4
1415	Sygnal dla dimerów kwasów karboksylowych
1711	C=O kwas karboksylowy
2854	Asymetryczne CH3 węglowodórów nasyconych
2925	Asymetryczne CH3 węglowodórów nasyconych

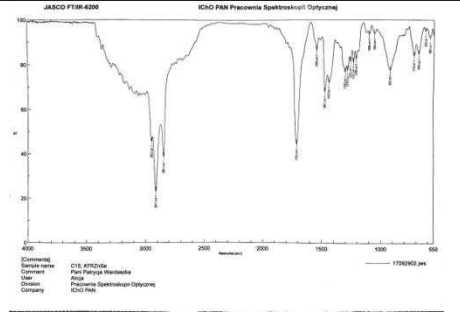
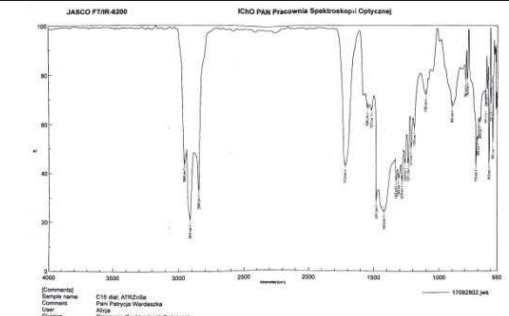
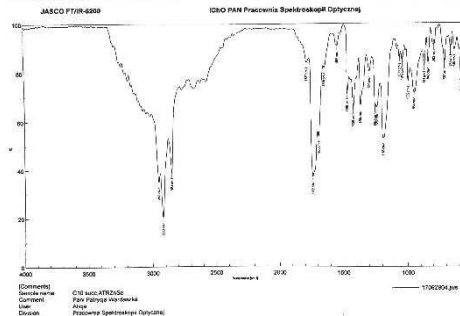
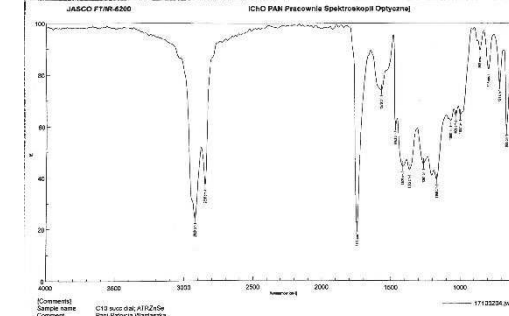
C14



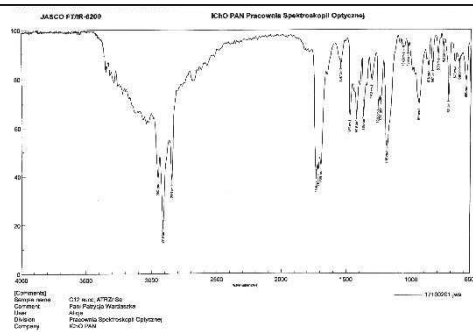
Częstość	Przyporządkowanie drgań
1698	Kwas karboksylowy C=O
2849	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)



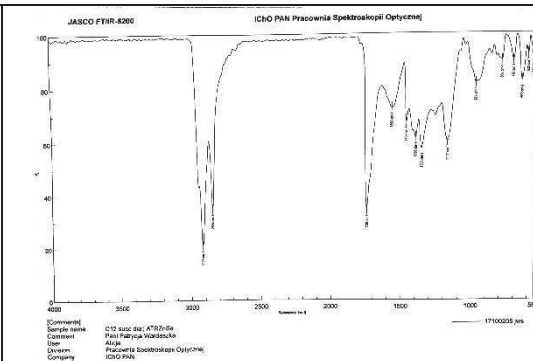
Częstość	Przyporządkowanie drgań
1394	sygnal dla dimerów kwasów karboksylowych
1703	C=O kwas karboksylowy
2850	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)
2920	asymetryczne CH3 węglowodórów nasyconych
2957	asymetryczne CH3 węglowodórów nasyconych

<p>C15</p>	 <p>JASCO FTIR-4200 ICHO PAN Pracownia Spektroskopii Optycznej</p> <p>[Comments] Sample name: C15_2172324 Comment: Fajr Polityca Warszawa User: Anja Division: Pracownia Spektroskopii Optycznej Company: ICHO PAN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1703</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> <tr> <td>2851</td> <td>Symetryczne walencyjne CH₂ (nasycone węglowodory)</td> </tr> <tr> <td>2917</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> <tr> <td>2953</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1703	Kwas karboksylowy C=O	2851	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)	2917	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	2953	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	 <p>JASCO FTIR-4200 ICHO PAN Pracownia Spektroskopii Optycznej</p> <p>[Comments] Sample name: C15_2172324 Comment: Fajr Polityca Warszawa User: Anja Division: Pracownia Spektroskopii Optycznej Company: ICHO PAN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1415</td> <td>sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych</td> </tr> <tr> <td>1712</td> <td>C=O kwas karboksylowy</td> </tr> <tr> <td>2849</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> <tr> <td>2914</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> <tr> <td>2959</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1415	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych	1712	C=O kwas karboksylowy	2849	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	2914	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	2959	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych				
Częstość	Przyporządkowanie drgań																											
1703	Kwas karboksylowy C=O																											
2851	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)																											
2917	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
2953	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
Częstość	Przyporządkowanie drgań																											
1415	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych																											
1712	C=O kwas karboksylowy																											
2849	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
2914	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
2959	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
<p>B10</p>	 <p>JASCO FTIR-4200 ICHO PAN Pracownia Spektroskopii Optycznej</p> <p>[Comments] Sample name: C15_2172324 Comment: Fajr Polityca Warszawa User: Anja Division: Pracownia Spektroskopii Optycznej Company: ICHO PAN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1188</td> <td>C-O estry</td> </tr> <tr> <td>1732</td> <td>Kwas karboksylowy C=O</td> </tr> <tr> <td>2854</td> <td>Symetryczne walencyjne CH₂ (nasycone węglowodory)</td> </tr> <tr> <td>2923</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> <tr> <td>2956</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1188	C-O estry	1732	Kwas karboksylowy C=O	2854	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)	2923	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	2956	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych	 <p>JASCO FTIR-4200 ICHO PAN Pracownia Spektroskopii Optycznej</p> <p>[Comments] Sample name: C15_2172324 Comment: Fajr Polityca Warszawa User: Anja Division: Pracownia Spektroskopii Optycznej Company: ICHO PAN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Częstość</th> <th>Przyporządkowanie drgań</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1168</td> <td>C-O estry</td> </tr> <tr> <td>1362</td> <td>sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych</td> </tr> <tr> <td>1409</td> <td>sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych</td> </tr> <tr> <td>1740</td> <td>C=O estry</td> </tr> <tr> <td>2856</td> <td>Symetryczne walencyjne CH₂ (nasycone węglowodory)</td> </tr> <tr> <td>2928</td> <td>asymetryczne CH₃ węglowodorów nasyconych</td> </tr> </tbody> </table>	Częstość	Przyporządkowanie drgań	1168	C-O estry	1362	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych	1409	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych	1740	C=O estry	2856	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)	2928	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych
Częstość	Przyporządkowanie drgań																											
1188	C-O estry																											
1732	Kwas karboksylowy C=O																											
2854	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)																											
2923	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
2956	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											
Częstość	Przyporządkowanie drgań																											
1168	C-O estry																											
1362	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych																											
1409	sygnał dla dimerów kwasów karboksylowych																											
1740	C=O estry																											
2856	Symetryczne walencyjne CH ₂ (nasycone węglowodory)																											
2928	asymetryczne CH ₃ węglowodorów nasyconych																											

B12

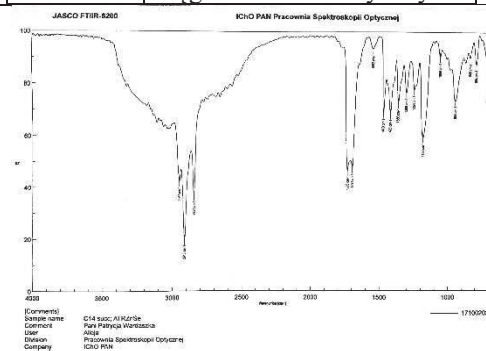


Częstość	Przyporządkowanie drgań
1689	Kwas karboksylowy C=O
1710	Kwas karboksylowy C=O
1726	C=O estry
2851	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)
2919	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych
2957	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych

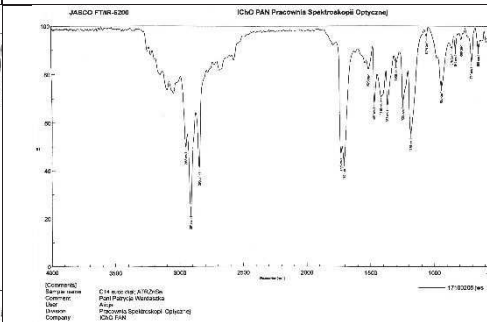


Częstość	Przyporządkowanie drgań
1738	C=O estry
2854	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)
2925	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych

B14



Częstość	Przyporządkowanie drgań
1691	Kwas karboksylowy C=O
1726	estry C=O
2851	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)
2918	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych
2957	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych



Częstość	Przyporządkowanie drgań
1701	Kwas karboksylowy C=O
1740	Estry C=O
2850	Symetryczne walencyjne CH2 (nasycone węglowodory)
2918	asymetryczne CH3 węglowodorów nasyconych

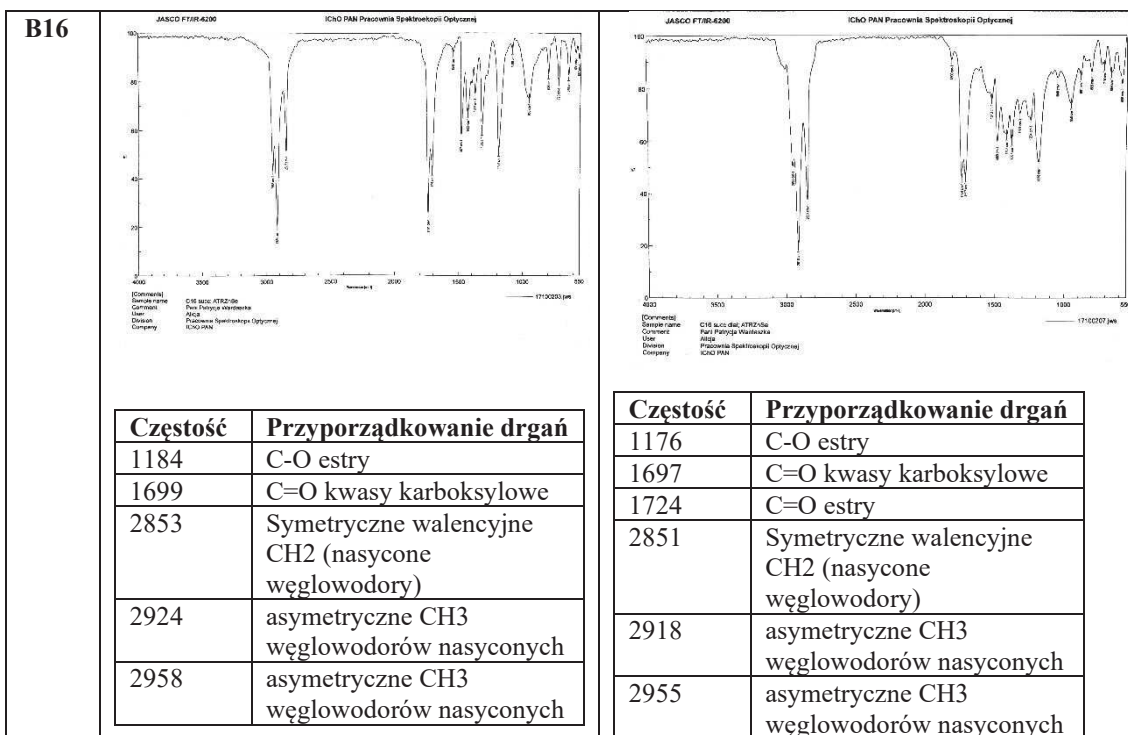


Tabela 17. Krzywe spektroskopowe dla poszczególnych substancji chemicznych wykorzystanych jako czynniki oplaszczające oraz krzywe wykonane po zakończeniu syntezy AgNPs.

4.4.2.2 Analiza elementarna

Wyniki analizy elementarnej pozwalają szacować o gęstości opłaszczenia AgNPs stabilizatorem. Większość masy C11 (ponad 83%) stanowi popiół, czyli srebro, które nie uległo procesowi spalania i nie stworzyło tlenków, które są substratem do analizy w analizatorze elementarnym. Pozostała część masy C11 przypada więc na stabilizator, jako że kwas karboksylowy składa się z węgla wodoru i tlenu, a obecność tych pierwiastków jest możliwa do analizy w analizatorze jakościowym, to na podstawie masy pierwiastków oraz znajomości budowy cząstki stabilizatora możliwe jest obliczenie stosunków molowych pomiędzy pierwiastkami. Dla C 11 stosunek molowy atomów węgla do atomów wodoru wynosił $3/2$, co oznacza, że w łańcuchu karboksylowym pojawiły się podwójne wiązania pomiędzy atomami węgla. Stosunek molowy pomiędzy atomami srebra i węgla dla C11 wynosił $11/1$, oznacza to że na jeden atom węgla przypada aż 11 atomów srebra. Na tej podstawie można wnioskować, że na powierzchni C11 znajduje się niewiele cząsteczek kwasów karboksylowych i gęstość opłaszczenia jest niewielka. Podobnie niewielką gęstością opłaszczenia, a także obecnością wiązań nienasyconych w łańcuchu karboksylowym charakteryzuje się również C15, gdyż stosunek atomów węgla do srebra jest $1/105$, a atomów węgla do wodoru wynosi $6/1$. Odmienne przedstawiają się wyniki analizy dla C13 i C14 oraz dla B10, B12, B14 i B16. Nanocząstki te wykazują duży stopień gęstości stabilizatora na swojej powierzchni, gdyż stosunki atomów węgla do srebra w tych AgNPs są bliskie jedności dla C13 i C14, a równe 1 dla wszystkich AgNPsB bursztynowego. Dla powyższych AgNPs nie stwierdzono również obecności wiązań nienasyconych w cząsteczkach stabilizatora. Analiza elementarna wykazała obecność atomów azotu w strukturze niektórych AgNPs, szczególnie tych w których gęstość opłaszczenia jest największa tj: C14, B10, B12, B16. Być może, że atomy azotu stanowiące większą część składu powietrza zostały uwięzione pomiędzy łańcuchami kwasu karboksylowego, jednak jest to tylko hipoteza. Szczegółowe wyniki analizy elementarnej dla AgNPsC przedstawiono w tabeli 18, a dla AgNPsB w tabeli 19. Uwzględniono masy molowe badanych substancji chemicznych i w oparciu o wartości procentowe uzyskane w wyniku spalania poszczególnych AgNPs obliczono stosunki molowe dla poszczególnych AgNPs. Wyniki przedstawiono w tabelach 20 i 21.

Rodzaj AgNPs	Procentowa zawartość węgla	Procentowa zawartość wodoru	Procentowa zawartość azotu	Procentowa zawartość popiołu (srebro)	Procentowa zawartość tlenu
C11	10,46	0,52	0	83,05	5,97
C12	-	-	-	-	100
C13	23,675	3,17	0	66,68	6,575
C14	57,545	9,665	1,5	19,79	11,455
C15	38,905	6,15	0,165	47,80	7,115

Tabela 18. Wyniki analizy elementarnej dla AgNPsC.

Rodzaj AgNPs	Procentowa zawartość węgla	Procentowa zawartość wodoru	Procentowa zawartość azotu	Procentowa zawartość popiołu (srebro)	Procentowa zawartość tlenu
B10	23,33	2,67	0	-	73,99
B12	48,86	6,115	0,12	29,13	15,775
B14	54,09	8,285	0	20,375	17,25
B16	52,41	8,3	0,165	22,75	16,375

Tabela 19. Wyniki analizy elementarnej dla AgNPsB.

	C11	C12	C13	C14	C15
Stosunek molowy atomów węgla do atomów wodoru	3/2	-	1/2	1/2	6/1
Stosunek molowy atomów srebra do cząsteczki kwasu karboksylowego	11/1	-	4/1	1/2	105/1

Tabela 20. Wyniki obliczeń stosunków molowych składników AgNPsC.

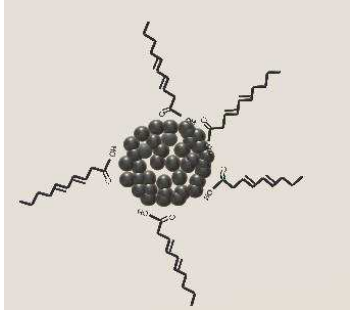
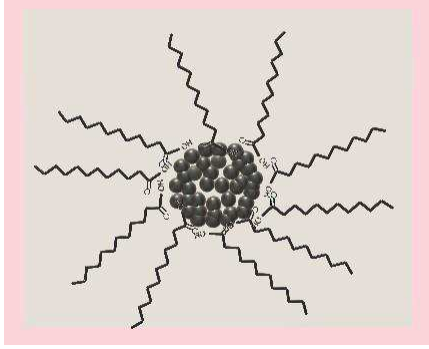
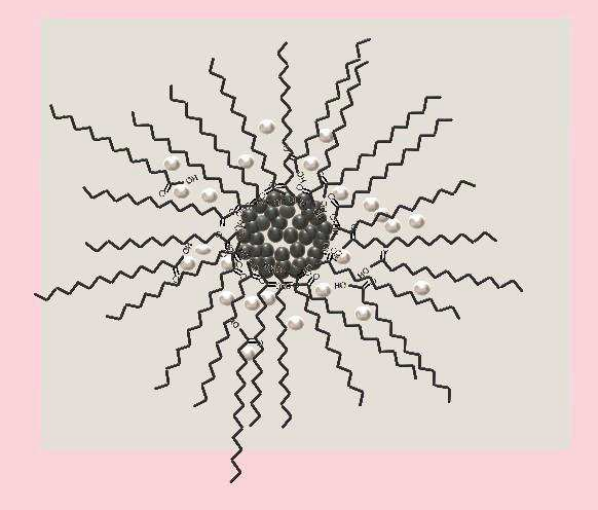
	B10	B12	B14	B16
Stosunek molowy atomów węgla do atomów wodoru	2/3	2/3	1/2	1/2
Stosunek molowy atomów srebra do cząsteczki kwasu karboksylowego	1/1	1/1	1/1	1/1

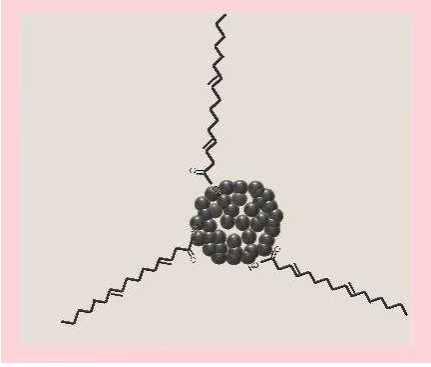
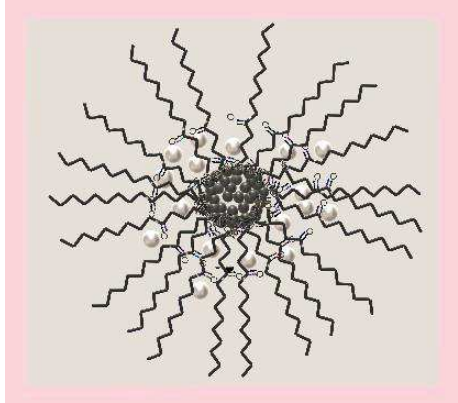
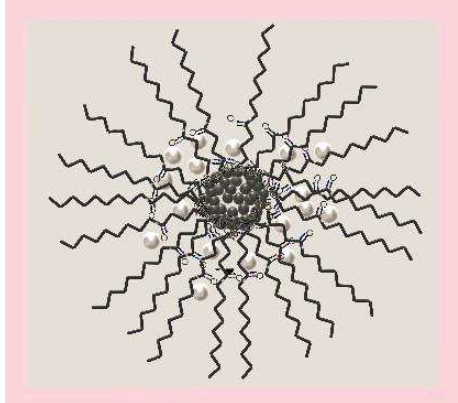
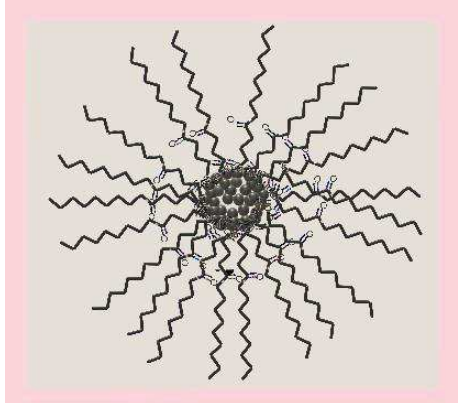
Tabela 21. Wyniki obliczeń stosunków molowych składników AgNPsB.

4.4.2.3 Podsumowanie wyników analiz fizykochemicznych

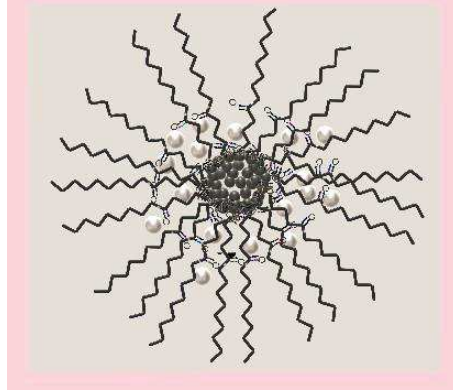
Przeprowadzone analizy pozwoliły na poznanie informacji o strukturze wytworzonych NPs. Na podstawie wyników badań spektroskopii UV-vis i DLS stwierdzono, iż średni rozmiar dla AgNPsC wynosi ok. 50nm. W trakcie syntezy AgNPsC doszło do modyfikacji w zakresie budowy stabilizatora: pojawiły się dimery kwasów karboksylowych oraz w niektórych cząsteczkach pojawiło się wiązanie nienasycone, przy czym warto nadmienić, iż użyte stabilizatory nie uległy procesom utleniania i redukcji i zachowały wiązania karboksylowe. Wyniki analizy elementarnej dostarczyły informacji o zagęszczeniu stabilizatora na powierzchni AgNPs. Dla AgNPsC gęstość opłaszczenia stabilizatorem różni się w zależności od rodzaju czynnika opłaszczającego. Zagęszczenie

stopniowo zwiększa się od C11 osiągając maksimum dla C14, w przypadku C15 jest porównywalne do C11. W przypadku AgNPsB stopień zagęszczenia był równie wysoki dla poszczególnych rodzajów stabilizatora. W przypadku AgNPs o wysokim zagęszczeniu stabilizatora pomiędzy cząsteczkami substancji opłaszczającej stwierdzono obecność atomów azotu (C14, B12 i B16). Na podstawie otrzymanych wyników skonstruowano modele dla badanych AgNPs. Wyniki przedstawiono w tabeli 22.

Nazwa AgNPs	Model AgNPs
C11	
C12	Zbyt mało danych na stworzenie modelu
C13	
C14	

<p>C15</p>	
<p>B10</p>	
<p>B12</p>	
<p>B14</p>	

B16



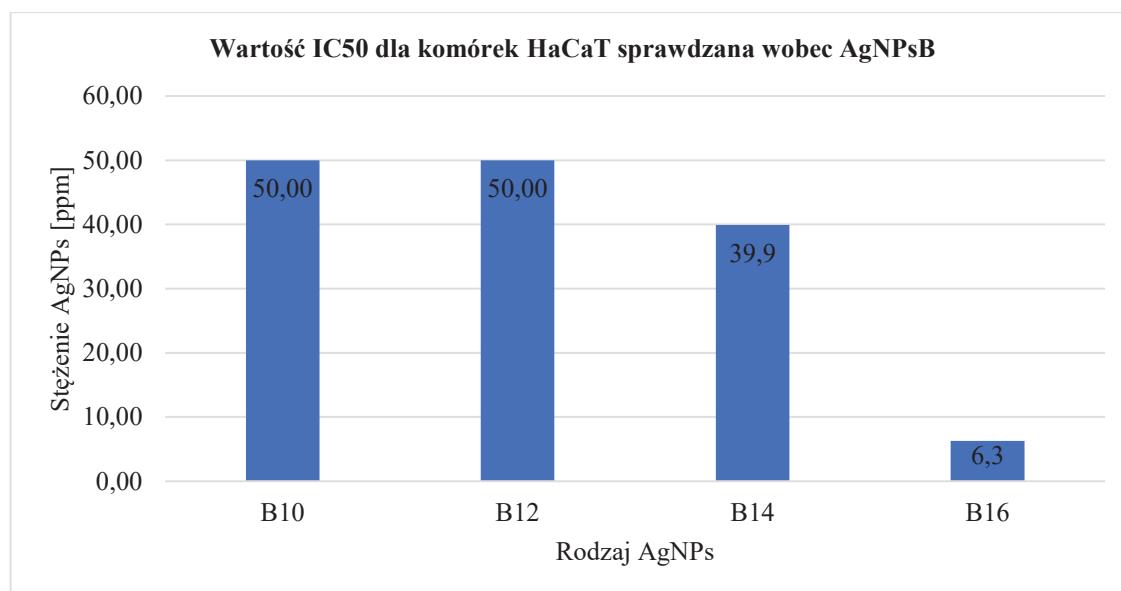
Zał: rozmiar AgNPs=constans

legenda: białe kulki – azot, szare kulki – srebro, łańcuchy – kwasy karboksylowe

Tabela 22. Modele AgNPs utworzone w oparciu o analizy fizykochemiczne.

4.5 Ocena cytotoksyczności AgNPs

Testy cytotoksyczności wobec komórek ludzkich stanowią wstęp do badań nad zastosowaniem substancji chemicznych w praktyce. AgNPs opłaszczone estrami kwasu bursztynowego i alkoholi długołańcuchowych wykazują największą stabilność kinetyczną i mikrobiologiczną, a także charakteryzują się najsilniejszym działaniem bakteriostatycznym wobec szczepów *S. aureus*. Stanowią one najbardziej interesującą grupę AgNPs potencjalnych miejscowych substancji bakteriobójczych. W kolejnym etapie badań postanowiono zweryfikować toksyczność tych AgNPs wobec ludzkich keratynocytów. Badania wykonano na linii HaCat dla AgNPsB. Największą cytotoksycznością charakteryzuje się AgNPs B16, gdyż 50% komórek umarło po zastosowaniu roztworu AgNPs w stężeniu 6,3 ppm. Jest to stężenie prawie dwukrotnie niższe niż średnia wartość MIC wobec szczepów *S. aureus* wynosząca 16,89. Stężenia cytotoksyczne wobec keratynocytów dla B10 (MIC=42,67), B12 (MIC=25,78) i B14 (12,44) okazały się wyższe niż wartości MIC dla poszczególnych roztworów, co sprawia że tylko te trzy rodzaje AgNPs mogą stanowić obiekt do dalszych badań nad wprowadzeniem NPs do lecznictwa.



Wykres 20. Cytotoksyczność AgNPsB wobec linii komercyjnej ludzkich keratynocytów.

5. Omówienie i dyskusja

W ostatnim dziesięcioleciu zainteresowanie tematem AgNPs wzrosło. Świadczy o tym rosnąca z roku na rok ilość publikacji naukowych poświęconych zagadnieniu nanotechnologii. Liczba wyników wyszukiwania hasła „silver nanoparticles” w wyszukiwarce PUB MED w 2008r wynosiła 388, co rok zwiększała się, a w 2018r. wynosiła już 1971. Wobec wzrastającej oporności szczepów bakteryjnych na antybiotyki i substancji bakteriobójcze właściwości przeciwbakteryjne AgNPs są intensywnie badane pod kątem możliwości zastosowania ich w przemyśle oraz w medycynie. Na rynku polskim znajdują się już opatrunki zawierające srebro nanokrystaliczne, roztwory przeznaczone do pielęgnacji podrażnionej skóry, krem i spray zawierające kompleks nanosrebra i nanotytanu. Preparaty zawierające AgNPs są dedykowane głównie do stosowania na skórę i błony śluzowe.

Istnieje szereg prac poglądowych dotyczących stosowania AgNPs na rany przewlekłe, w których wskazuje się AgNPs jako doskonałą alternatywę dla obecnie stosowanych produktów dedykowanych do leczenia owrzodzeń^{7,52-57}. Na podstawie tych prac poglądowych postanowiono sobie za cel znalezienie wysoce skutecznych AgNPs wobec szczepów *S. aureus* izolowanych z ran przewlekłych i w kolejnym etapie stworzenie opatrunków przeciwbakteryjnych zawierających AgNPs. Aby osiągnąć cel postanowiono na podstawie danych literaturowych dokonać syntezy AgNPs. Wielokrotne próby syntezy AgNPs nie pozwoliły na uzyskanie produktu o wystarczającej trwałości, aby przeprowadzić trwające trzy dni badania mikrobiologiczne. Zastanawiający był fakt, iż autorzy niektórych publikacji pomimo uzyskania niestabilnych AgNPs wykonywali dalsze badania biologiczne i na ich podstawie wyciągali wnioski naukowe.

Postanowiono więc przeprowadzić szczegółowe badania o charakterze interdyscyplinarnym (z dziedzin dermatologii, mikrobiologii i chemii), rozpoczynając od szczegółowego przeglądu literatury dotyczącego metod syntezy NPs i zbadać wpływ różnych czynników na działanie przeciwegronkowcowe AgNPs.

Kalashnikova i wsp. utrzymują, że istotnym czynnikiem umożliwiającym zastosowanie NPs w praktyce jest stabilność NPs w rozpuszczalniku¹⁷. Patakfalvi i Dékány, udowodnili na podstawie AgNPs opłaszczanych kwasem cytrynowym, że użycie stabilizatora (substancji opłaszczającej) chroni AgNPs przed agregacją⁵⁸. Paredes i wsp. wskazują, że kationowe surfaktanty wykazują wysoką skuteczność jako

stabilizatory roztworów AgNPs⁵⁹. Efekt ten tłumaczą Labile i Brant i wskazują, że nanocząstki naturalnie dążą do uzyskania stanu o korzystniejszym układzie termodynamicznym i ulegają agregacji. Zwiększenie rozmiaru materii doprowadza z kolei do utraty szczególnych właściwości, typowych dla struktur „nano”¹⁷. W pracach Li i wsp. przedstawiono wyniki badań nad trwałością NPs opłaszczanych PVP, Tweenem (rodzaj polimeru) i kwasem cytrynowym^{37,60}. Stwierdzono, że te NPs są nietrwałe w warunkach eksperymentu tj. w czasie 960s. Autorzy pracy zwrócili ponadto uwagę, iż rodzaj zastosowanej substancji stabilizującej ma wpływ na trwałość AgNPs. Malina i wsp. przeprowadzili badania nad wpływem użycia PVP w różnych stężeniach na stabilność AgNPs¹⁹. Autorzy utrzymywali, że otrzymane przez nich AgNPs wykazują stabilność przez kilka miesięcy, czego nie potwierdzono w badaniach własnych wykonanych na podstawie publikacji autorstwa Malina i wsp. Dokonano syntezy AgNPs opłaszczanych PVP o różnej masie cząsteczkowej i potwierdzono stabilność AgNPs opłaszczanych PVP w czasie trwania eksperymentu tj. 14 dni, oraz utrzymania przez w.w AgNPs właściwości przeciwwronkowcowych przez mniej niż 4 tyg. od zakończenia procesu syntezy. Można przypuszczać na podstawie porównania NPs wykorzystanych w pracy Li i wsp. (stabilnych przez mniej niż 16 min) oraz NPs Maliny i wsp. (stabilnych przez przy najmniej 14 dni), iż nie tylko rodzaj stabilizatora wpływa na trwałość AgNPs, ale również sposób syntezy, jest to jednak hipoteza wymagająca dalszych badań. Natomiast powtarzając syntezę AgNPs na podstawie pracy Le i wsp. stwierdzono, że opłaszczone kwasem oleinowym NPs srebra są stabilne w czasie kilku miesięcy, co wyróżnia je spośród innych NPs⁵¹. Warto jednak zwrócić uwagę, że w budowa kwasu oleinowego jest złożona, gdyż w jego strukturze występuje wiązanie podwójne. To sprawia, iż trudno ustalić co ma wpływ na jego właściwości stabilizujące NPs (długość łańcucha węglowego, obecność podwójnego wiązania czy jego lokalizacja w łańcuchu węglowym). Mając na uwadze mnogość czynników mogących mieć wpływ na zachowanie AgNPs uznano, za zasadne podjęcie systematycznych badań nad wpływem długości łańcucha węglowego na stabilność AgNPs, co mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia w jaki sposób stabilizator wpływa na trwałość. Opracowano więc własny sposób syntezy NPs opłaszczanych prostymi nienasyconymi kwasami karboksylowymi. W badaniach własnych udowodniono, że wydłużanie o jeden węgiel wpływa na trwałość AgNPs oraz na stan skupienia otrzymywanego produktu reakcji. Stabilne w czasie powyżej 14 dni okazały się być nanocząstki opłaszczane kwasami: undekanowym, dodekanowym, tridekanowym, tetradekanowym, i pentadekanowym. AgNPs

opłaszczane kwasem palmitynowym ($C_{15}H_{31}COOH$) i kwasami o dłuższymi niż 15 węgli łańcuchu karboksylowym miały postać żelu, co uniemożliwiało dalsze badania i ograniczyło możliwość dalszej modyfikacji łańcucha. Warto zauważyć również, iż budowa chemiczna stabilizatora charakteryzująca się długim łańcuchem węglowym stwarza możliwości dalszych modyfikacji cząsteczki poprzez dołączanie do niego innych molekuł np. antybiotyków. Im dłuższy jest łańcuch tym większa łatwość dołączenia innej cząsteczki. Stwarza to perspektywy do podjęcia dalszych badań nad syntezą wysoce specyficznego działającego AgNPs. Możliwości wynikające z zastosowania stabilizatorów zawierających długie łańcuchy węglowe skłoniły do podjęcia badań nad poszukiwaniem stabilnych, długołańcuchowych AgNPs które będą w formie płynnej, a nie żelowej jak AgNPs opłaszczane kwasem palmitynowym. Takim rodzajem stabilizatora okazały się być estry kwasu bursztynowego i alkoholi długołańcuchowych, które wykazywały stabilność kinetyczną (badaną spektrofotometrycznie) przez przynajmniej 14 dni. Podsumowując, ważne jest spektrofotometryczne sprawdzanie stabilności kinetycznej AgNPs w czasie, nawet jeżeli korzysta się z metod wcześniej opisanych przez innych badaczy. W badaniach własnych do testów mikrobiologicznych wyselekcjonowano tylko te nanocząstki których trwałość wynosiła 14 dni.

Kolejnym ważnym aspektem koniecznym do spełnienia w kontekście użycia AgNPs jako substancji przeciwdrobnoustrojowej oprócz stabilności w roztworze jest utrzymywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych w czasie. W literaturze nie odnaleziono badań na ten temat. Przeprowadzone badania własne na ten temat wskazują, że AgNPs opłaszczane przez PVP tracą działanie biologiczne w ciągu 4 tygodni od zakończenia procesu syntezy. AgNPs opłaszczane długołańcuchowymi kwasami karboksylowymi wykazują działanie przeciwegronkowcowe przez przynajmniej 4 tyg. Natomiast AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego zachowują swoje działanie przeciwegronkowcowe przez 3 miesiące, AgNPsB16 nawet pół roku. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, iż możliwe jest uzyskanie takiego rodzaju AgNPs, które będą mogły służyć do badań biologicznych, gdyż są stabilne w czasie potrzebnym do przeprowadzenia testów. Co więcej utrzymywanie działania przeciwegronkowcowego przez nawet 6 miesięcy jest obiecującą perspektywą na wprowadzenie stabilnych AgNPs na rynek medyczny.

Bardzo trudno zweryfikować czy działanie biologiczne stosowanych roztworów nanocząstek jest spowodowane działaniem jonów srebra, srebra koloidalnego czy też NPs będących produktami reakcji chemicznej syntezy AgNPs¹⁸. Z tego względu konieczne

wydaje się być oczyszczenie mieszaniny poreakcyjnej, gdyż tylko zastosowanie oczyszczonych AgNPs pozwala na uzyskanie obiektywnych wyników badań biologicznych. Opisano kilka metod oczyszczania NPs metali. Wirowanie i wysalanie roztworu przy użyciu chlorku sodu są dobrze znanymi metodami oczyszczania⁶¹⁻⁶³. Esmaeillou i wsp. opisują oczyszczanie za pomocą redispersji w wodzie destylowanej oraz następczej sonikacji (dyspersja z użyciem ultradźwięków) NPs⁶⁴. Jedną z najskuteczniejszych metod oczyszczania NPs jest elektroforeza, która zapewnia otrzymanie czystych oraz homogenicznych pod względem rozmiaru i kształtu NPs. Jest to jednak metoda skomplikowana, kosztowna i może być użyta do małych ilości roztworów. Inną metodą którą można zastosować jest dializa. Ten sposób oczyszczania był stosowany w badaniach podstawowych, w których badano kinetykę agregacji AgNPs^{17,37}. W pojedynczych pracach dotyczących działania przeciwdrobnoustrojowego użyto dializy do oczyszczania roztworu NPs⁶⁵. W przeciwieństwie do elektroforezy jest to prosty, tani, wydajny i możliwy do stosowania dla dużych ilości roztworów NPs. W pracy Iwalokuna i wsp. dokonano syntezy AgNPs w sposób zbliżony do zaproponowanego w badaniach własnych. Za pomocą borowodoru sodu zredukowano AgNO₃, natomiast jako czynnika opłaszczającego użyto żelatynę. Autorzy pracy również zauważyli, iż obecność jonów srebra może wpływać na wyniki badań i oczyszczali NPs przy pomocy dializy, a proces syntezy kontrolowano za pomocą spektrofotometru. Otrzymano NPs wielkości ok. 5 nm. Niestety nie jest wiadomym jak trwale są AgNPs otrzymane przez autorów pracy²⁰. Jak wskazują wyniki badań własnych dializa jest efektywnym sposobem oczyszczania AgNPs, gdyż wykazano istotną statystycznie różnicę w działaniu przeciwdrobnoustrojowym wobec 9 z 11 różnych rodzajów AgNPs. Pomimo tego, iż dializa była stosowana w badaniach nad AgNPs to wyniki porównujące działanie przeciwdrobnoustrojowe mieszaniny poreakcyjnej dializowanej i niedializowanej nie były opublikowane. W badaniach własnych największe znaczenie dializy stwierdzono dla AgNPsPVP, a najmniejsze dla AgNPsC. Ten fakt można wytłumaczyć tym, że AgNPsPVP charakteryzowały się małą siłą działania przeciwbakteryjnego, niewiele większą od AgNO₃ (wartości MIC wynosiły ok. 512 ppm), natomiast AgNPsC wykazywały bardzo silne działanie przeciwdrobnoustrojowe (wartości MIC wynosiły ok. 32 ppm), co powoduje, że w nieoczyszczonym roztworze działanie AgNPsC dominuje i różnica pomiędzy dwoma roztworami jest mała. Cennym dowodem byłoby wykazanie działania przeciwbakteryjnego płynu dializacyjnego, który zawiera tylko zanieczyszczenia. Ograniczeniem dla tego typu badań było duże

rozcieńczenie płynu dializacyjnego wynikające z zastosowanej metody, tj. oczyszczany roztwór AgNPs umieszczony był w worku z błony półprzepuszczalnej zanurzonym w wodzie destylowanej, która była wymieniana. Zanieczyszczenia przenikały do wody, a zateżnienie płynu dializacyjnego do stężenia wyjściowego było prawie niemożliwe.

Z przeprowadzonych badań własnych wynika, iż zanim próby badania właściwości biologicznych AgNPs zostaną podjęte, należy sprawdzić trwałość uzyskanych produktów oraz oczyścić mieszaninę poreakcyjną z molekuł mogących zakłócić wyniki prowadzonych testów.

Powszechnie twierdzi się, że AgNPs wykazują działanie przeciwbakteryjne, niszczą biofilm, działają przeciwpierwotniakowo i przeciwgrzybiczo, a także przeciwnowotworowo. Nie oznacza to jednak, że każdy rodzaj AgNPs wykazuje te wszystkie cechy, co obrazuje przykład z badań własnych: AgNPsPVP, które charakteryzowały wartości MIC powyżej 512ppm, oznaczające w praktyce brak działania przeciwgronkowcowego. Działanie AgNPs uzależnione jest od wielu czynników takich jak: kształt, wielkość, oraz rodzaj stabilizatora. O ile dosyć dobrze udokumentowany jest wpływ dwóch pierwszych cech, o tyle wpływ opłaszczenia wymaga szczegółowych badań. Można odnaleźć prace w których autorzy wskazują jako czynnik wpływający na działanie przeciwbakteryjne AgNPs metodę syntezy, nie uwzględniając że użyli nanocząstek opłaszczanych trzema różnymi stabilizatorami. W pracy Kumar i wsp. przeprowadzono badania w których porównywano AgNPs otrzymywane trzema różnymi metodami: redukcja AgNO₃ za pomocą ekstraktu z zielonej herbaty (metoda biologiczna), redukcja AgNO₃ za pomocą glukozy (synteza organiczna) oraz redukcja AgNO₃ przy użyciu borowodorku sodu. Warto zwrócić uwagę, iż zarówno substancje zawarte w ekstrakcie z zielonej herbaty jak i glukoza stanowią potencjalne czynniki opłaszczające i chroniące przed agregacją, natomiast w trzecim przypadku borowodorki nie jest substancją opłaszczającą tylko czynnikiem redukującym, co doprowadzi do szybkiej agregacji otrzymanych AgNPs oraz znacznie zmniejszy ich siłę działania przeciwbakteryjnego. Wyniki przedstawione przez Kumara i wsp. wskazują, iż chociaż nanocząstki otrzymane przy użyciu borowodorku sodu wykazywały najmniejszą polidispersyjność, to brak substancji opłaszczającej spowodował, że strefa zahamowania wzrostu *S.aureus* była najmilsza w porównaniu z dwiema pozostałymi substancjami. Poza tym otrzymane AgNPs różniły się rozmiarem: AgNPs redukowane zieloną herbatą miały wielkość 30-40nm, glukozą 90-120nm, a NaBH₄ 90-100nm³². Niektórzy badacze udowodnili, że czynnik opłaszczający wpływa na siłę działania przeciwgronkowcowego,

ale nie zaakcentowali tego faktu w pracy. Na przykład Hyoyeong i wsp. , którzy na 19 szczepach MRSA, wskazują, iż nanocząstki srebra stabilizowane przez surfaktant CTAB o wielkości ok. 15nm cechują wartości MIC od 15.6 do 62.5ppm, natomiast AgNPs stabilizowane SDS charakteryzowały wartości MIC >125ppm, co uznano za brak aktywności przeciwbakteryjnej⁶⁶. Pojedyncze doniesienia wskazują na rolę czynnika opłaszczającego, jako czynnika dzięki któremu możliwa jest modyfikacja działania AgNPs. AbuDalo i wsp udowodnili że w zależności od użytego stabilizatora zmienia się siła działania przeciwgronkowcowego Nps. Chociaż badanie wykonano tylko dla dwóch różnych czynników opłaszczających to jego wyniki tego badania potwierdzają hipotezę stawianą w badaniach własnych, że czynnik opłaszczający ma wpływ na właściwości przeciwbakteryjne AgNPs. W pracy AbuDalo i wsp. do produkcji AgNPs wykorzystano zmodyfikowaną reakcję Tollensa. NPs syntezowano metodą chemiczną z wykorzystaniem jonów $[Ag(NH_3)_2]^+$ oraz ekstraktów z liści rozmarynu oraz oliwki jako czynnika redukującego i substancji opłaszczającej. NPs oczyszczano za pomocą ultrafiltracji w celu pozbycia się Ag^+ i PVP oraz NaOH użytych w procesie syntezy. Otrzymano AgNPs podobnej wielkości jak w badaniach własnych tj. 70nm i 64nm, co potwierdzono również przy użyciu metody DLS. Sprawdzano, czy czynniki opłaszczające uległy modyfikacjom podczas procesu syntezy AgNPs. Właściwości przeciwbakteryjne sprawdzono dla jednego szczepu *S.aureus* ATCC 25923, dla AgNPs opłaszczanych substancjami zawartymi w ekstrakcie z liści rozmarynu MIC wyniósł 4,69 ppm, natomiast z liści oliwki 9.38¹⁵. Co więcej, Kalashnikova i wsp. w swojej pracy na temat użycia nanomateriałów w leczeniu ran przewlekłych wskazują, że opłaszczanie AgNPs za pomocą glikozaminoglikanów: siarczanu chondroityny oraz siarczanu acharanu nie tylko chroni przed agregacją, ale również stymuluje proces gojenia ran. Niektórzy badacze zastosowali czynniki opłaszczające jako molekuly mogące zwiększyć specyficzność działania AgNPs w stosunku do określonych szczepów bakterii. Kuo i wsp. zaprojektowali nanocząstki złota opłaszczane pentapeptydem DVFLG zawierającym tryptofan i argininę i wykazującym powinowadztwo do MRSA oraz nie wykazywać cytotoksycznego efektu wobec komórek eukariotycznych. Badacze swoją teorię oparli na porównaniu budowy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które zawierają zawierają indolicydynę i tritrypticinę. Te dwa peptydy zawierają argininę i tryptofan, które hamują wzrost bakterii. Tryptofan interkaluje z dwuwarstwą lipidową bakterii, prowadząc do jej destrukcji, arginina jest dodatnio naładowana, więc wchodzi w interakcję z ujemnie naładowaną ścianą komórki bakteryjnej³⁶. Powyższe przykłady

wskazują, że modyfikacja powierzchni NPs za pomocą stabilizatora stwarza wiele możliwości na kreowanie wysoce specyficznym działających molekuł. Pogłębienie wiedzy w tym zakresie pozwoli na lepsze zrozumienie czynników wpływających na działanie AgNPs i być może pozwoli na odkrycie nowych zastosowań dla NPs. Dlatego też, postanowiono wykonać pionierskie badania na 15 różnych rodzajach AgNPs podzielonych na trzy grupy główne i spróbować wyjaśnić w jaki sposób rodzaj stabilizatora wpływa na siłę działania przeciwbakteryjnego AgNPs. Jako, że w badaniach podstawowych udowodniono wysoką trwałość AgNPs opłaszczanych PVP, kwasami karboksylowymi oraz estrami kwasu bursztynowego i alkoholi długowęglowych, a dwa ostatnie czynniki dają możliwości dalszej modyfikacji cząstek, użyto więc tych trzech grup substancji. W każdej grupie znajdowało się od 4 do 6 różnych rodzajów AgNPs, które charakteryzowały się niewielkimi różnicami w budowie stabilizatora np. ilość węgla w łańcuchu. Umożliwiło to prowadzenie systematycznych badań i wyciągnięcie precyzyjnych wniosków. Rzetelne porównanie dwóch substancji jest możliwe wtedy, kiedy badane obiekty różni tylko jeden czynnik, który jest aktualnie badany. Dlatego też ważne było stworzenie AgNPs o tym samym kształcie, zbliżonym rozmiarze oraz syntezowanych w ten sam sposób, w przypadku badań własnych metoda chemiczna polegająca na redukcji jonów srebra za pomocą borowodoru sodu. Przeprowadzone badania fizykochemiczne potwierdziły że otrzymane AgNPs charakteryzowały się zbliżonym rozmiarem, a czynnik opłaszczający nie ulegał znaczącym modyfikacjom w trakcie syntezy. Testy mikrobiologiczne wykazały, że siła działania przeciwgronkowcowego zmienia się w zależności od czynnika opłaszczającego. AgNPs wykazały się najslabszym działaniem przeciwgronkowcowym, podczas gdy AgNPsC i AgNPsB najsilniejszym. Co więcej analizując poszczególne wyniki MIC w grupie AgNPsC okazało się, że im większa ilość węgla w łańcuchu karboksylowym tym silniejsze działanie danej substancji (C11<C12<C13<C14), ale (C14>C15). W grupie AgNPsB wykazano podobną zależność (B10>B12>B14>B16), przy czym nie zaobserwowano spadku aktywności pomiędzy B14, a B16. Ponadto siła działania C14 i grupy AgNPsB były zbliżone. Wykonane analizy fizykochemiczne pozwoliły na stworzenie modeli AgNPs oraz pokazały w jaki sposób stopień opłaszczenia wpływa na budowę AgNPs. Okazało się, że zwiększenie długości łańcucha karboksylowego o jeden węgiel znacząco zmienia stopień opłaszczenia AgNPsC przez stabilizator. Na podstawie otrzymanych wyników fizykochemicznych i badań mikrobiologicznych można postawić hipotezę, że im większy stopień opłaszczenia AgNPs przez stabilizator tym siła działania

przeciwgronkowcowego jest większa, gdyż C14, B10, B12, B14 i B16 charakteryzuje zarówno podobna morfologia jak i niskie wartości MIC. W badaniach własnych jako stabilizator użyte zostały lipofilne związki organiczne takie jak długołańcuchowe kwasy karboksylowe i estry alkoholi długołańcuchowych i kwasu bursztynowego. He i wsp. opublikowali pracę pogładową dotyczącą interakcji NPs z błonami biologicznymi, gdzie jednym z opisanych sposobów wnikania NPs do wnętrza komórki była adsorbcja. Autorzy wskazują, że w procesie adsorbcji kluczową rolę odgrywa rozpuszczalność substancji w tłuszczach. Im powierzchnia NPs jest bardziej lipofilna, tym skuteczniej penetruje przez dwuwarstwą lipidową⁶⁷. Można przypuszczać, że im stopień opłaszczenia NPs przez lipofilną substancję jest większy tym penetracja do wnętrza komórki bakteryjnej większa. Udowodnienie tej hipotezy wymaga jednak przeprowadzenia szczegółowych badań. Wyjaśnienia wymaga również fakt jaki czynnik dodatkowy wpłynął na różnice w sile działania przeciwdrobnoustrojowego w grupie AgNPsB. Wykazano różnicę w wartościach MIC pomiędzy B10, a B16 wynoszącą 26 ppm, a więc niewielką, przy czym poszczególne różnice były istotnie statystycznie różne).

Mechanizm działania AgNPs wskazuje, iż działanie przeciwbakteryjne nanomolekół jest silniejsze wobec bakterii gram ujemnych z uwagi na cieńszą ścianę komórkową. Przypuszcza się, że jest to powód ograniczenia ilości badań na gram dodatnich gronkowcach złocistych. Nadrzędnym celem prowadzonych badań własnych było wyselekcjonowanie takiego rodzaju AgNPs który mógłby mieć zastosowanie w leczeniu ran przewlekłych, a jedną z najczęściej izolowanych bakterii z owrzodzeń jest gronkowiec złocisty. Dlatego zdecydowano się na badanie bakterii gram dodatnich wobec których udowodniono mniejszą skuteczność AgNPs. *S. aureus* jest to również gatunek bakterii wywołujący infekcje w ranie. *S. aureus* charakteryzuje się zdolnością do wytwarzania czynników oporności, a pierwszy szczep metycylinoporny wyizolowany został od pacjenta z owrzodzeniem. Ponadto z uwagi na fakt, że dużo cenniejsze są testy wykonywane na dzikich szczepach bakteryjnych badania własne postanowiono przeprowadzić na szczepach *S. aureus* izolowanych od pacjentów z owrzodzeniami żylnymi. Z kolei ze względu na potrzebę porównania wyników własnych z opublikowanymi wykorzystano trzy szczepy referencyjne. Niestety w kontekście AgNPs prawie niemożliwe jest porównywanie wykonanych wyników z opublikowanymi, gdyż niewielkie modyfikacje procesu syntezy mogą wpłynąć na działanie AgNPs. Poza tym bardzo często działanie przeciwdrobnoustrojowe jednego rodzaju AgNPs udowodniane jest na pojedynczych szczepach różnych bakterii. Dla przykładu w pracy

Nanda i wsp. metodą biologiczną z wykorzystaniem szczepu gronkowca złocistego dokonano syntezy AgNPs, i przy pomocy metody krążkowo dyfuzyjnej sprawdzono działanie NPs na sześciu szczepach różnych gatunków bakterii (w tym na jednym szczepie MRSA)⁶⁸. Polskie badanie autorstwa Krychowiak i wsp. dotyczyło użycia AgNpS w połączeniu z wyciągiem z rosiczki dwudzielnej jako produktu do leczenia ran. Badano komercyjne AgNPs, których nie scharakteryzowano przed użyciem, sprawdzano działanie AgNPs wobec trzech szczepów referencyjnych *S.aureus*. Wartości MBC dla badanych związków oscylowały w granicach 6.15ppm dla AgNPs oraz dla wyciągu z rosiczki 16ppm. Ukazały się jednak prace w których do badań użyto kilkudziesięciu różnych szczepów *S. aureus*. Badanie autorstwa Ansari i wsp obejmowało 62 szczepy *S. aureus*. Autorzy sprawdzali właściwości przeciwbiofilmowe jednego rodzaju AgNPs, komercyjnie dostępnego. Nie wykonano jednak, ani oczyszczenia roztworu, ani nie weryfikowano trwałości roztworu przed użyciem, co znacząco obniża wiarygodność uzyskanych wyników. Badaniem o wysokiej wartości wartym przytoczenia praca Iwalokuna i wsp. z 2019r., w którym na 119 szczepach *S.aureus* (w tym 52 MRSA, potwierdzonych metodami genetycznymi) scharakteryzowanych pod kątem antybiotykowrażliwości, przebadano jeden rodzaj AgNPs²⁰. Jak już wspomniano wyżej omawiając proces oczyszczania AgNPs, autorzy badania przed użyciem AgNPs sprawdzali trwałość roztworu przy pomocy spektrofotometru, oraz oczyszczili je przy pomocy dializy.

Przeprowadzone badania własne pokazały, że pomimo swej rosnącej popularności AgNPs nadal pozostają w dużej mierze niepoznane. Wyniki badań wykazały ogromną rolę czynnika opłaszczającego w utrzymywaniu stabilności i wpływającego na działanie przeciwgronkowcowe AgNPs. Pomimo przebadania trzech różnych grup AgNPs kryteria stawiane substancji o potencjale do wprowadzenia na rynek spełniły tylko dwa rodzaje AgNPs: B12 i B14. Tylko one charakteryzowały się bardzo dużą siłą działania przeciwgronkowcowego, która w sposób statystycznie istotny utrzymywała się przez 3 miesiące. Co więcej tylko wobec tych dwóch rodzajów nanocząstek wykazano cytotoksyczność dla komórek naskórka w dużo większym stężeniu niż stężenia bakteriostatyczne. Mając na uwadze otrzymane wyniki badań należy z wielką ostrożnością podchodzić do wprowadzanych produktów zawierających nanocząstki metali i żądać od producentów rzetelnych wyników badań na temat produktu. Ponadto należy mieć na uwadze fakt, iż pomimo rosnącej popularności AgNPs wiele istotnych kwestii nie zostało jeszcze zbadanych, a obecny stan wiedzy nie pozwala

na jednoznaczne uznanie AgNPs jako substancji o dobrze znanym mechanizmie działania, w pełni bezpiecznych dla człowieka i środowiska. Nie do końca poznane są również czynniki wpływające m in. na: stabilność, działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz cytotoksyczność i zachowanie AgNPs w ustroju.

PODSUMOWANIE

Jest to pierwsza praca w której przeprowadzono systematyczne badania nad właściwościami AgNPs dla tak dużej liczby różnych rodzajów AgNPs (15 substancji).

Trwałość roztworów nanocząstek weryfikowano nie tylko szeroko stosowanymi metodami spektrofotometrycznymi, ale podjęto pionierskie badania sprawdzające aktywność przeciwdrobnoustrojową w czasie. Potwierdzono wpływ czynnika opłaszczającego na trwałość kinetyczną oraz mikrobiologiczną AgNPs. Ponadto po raz pierwszy udowodniono, że nie tylko kształt i rozmiar AgNPs wpływa na siłę działania przeciwdrobnoustrojowego, ale istotny wpływ ma również rodzaj substancji opłaszczającej. Ponadto postarano się wyjaśnić na podstawie badań fizykochemicznych i mikrobiologicznych w jaki sposób czynnik opłaszczający wpływa na siłę działania przeciwegronkowcowego AgNPs.

Na podstawie wyników analiz mikrobiologicznych i badaniach cytotoksyczności wytypowano związek, który mógłby stanowić potencjalnie preparat miejscowy o działaniu przeciwegronkowcowym.

Poza tym po raz pierwszy wykazano, iż roztwory AgNPs przed użyciem należy oczyszczać z pozostałych po syntezie produktów reakcji, gdyż zakłócają one wyniki badań biologicznych, a dializa jest efektywną i taną metodą oczyszczania AgNPs.

6. Wnioski

1. Opracowanie metody syntezy kinetycznie stabilnych AgNPs

Opracowano metodę syntezy AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi oraz estrami kwasu bursztynowego i alkoholi długołańcuchowych.

2. Ocena stabilności kinetycznej AgNPs oraz siły działania przeciwgronkowcowego w czasie

Wykazano, że użyte do badań AgNPs wykazywały stabilność kinetyczną pozwalającą na prowadzenie badań biologicznych. Po raz pierwszy wykazano, że rodzaj substancji opłaszczającej wpływa na utrzymywanie siły działania przeciwgronkowcowego AgNPs w czasie. AgNPs opłaszczane estrami kwasu bursztynowego wykazywały najsilniejsze działanie przeciwgronkowcowe i utrzymywały stałe działanie przeciwdrobnoustrojowe przez trzy miesiące. AgNPs opłaszczane PVP i kwasami karboksylowymi stopniowo traciły swoje właściwości w ciągu 4 tygodni.

3. Ocena wpływu oczyszczania AgNPs za pomocą dializy na działanie przeciwdrobnoustrojowe AgNPs

Udowodniono, że oczyszczanie za pomocą dializy pozwala na usunięcie z roztworu AgNPs składników wykazujących działanie biologiczne. Ponadto przeprowadzenie procesu oczyszczania wydaje się być konieczne przed przystąpieniem do badań nad działaniem biologicznym AgNPs, w celu otrzymania wiarygodnych wyników.

4. Ocena wpływu substancji opłaszczającej na działanie przeciwgronkowcowe AgNPs

Przeprowadzone po raz pierwszy systematyczne badanie oceniające wpływ substancji opłaszczającej na działanie biologiczne AgNPs potwierdziło, że rodzaj stabilizatora wpływa na siłę działania przeciwgronkowcowego AgNPs. Nieznaczne modyfikacje budowy chemicznej stabilizatora pozwalają na modulację zarówno siły działania przeciwdrobnoustrojowego jak i cytotoksyczności.

5. Ustalenie struktury badanych AgNPs przy pomocy metod fizykochemicznych

NPs opłaszczane kwasami karboksylowymi i estrami kwasu bursztynowego o różnej długości łańcucha węglowego w cząsteczce charakteryzują się podobnym rozmiarem, natomiast różnią się stopniem opłaszczenia przez zastosowany czynnik opłaszczający, który nie bierze udziału w procesie powstawania AgNPs i nie ulega modyfikacji podczas tego procesu, natomiast wpływa na działanie biologiczne AgNPs.

6. Wyselekcjonowanie AgNPs o silnym działaniu przeciw gronkowcowym i niskiej cytotoksyczności wobec komórek skóry, które potencjalnie mogłyby być wykorzystane do badań naukowych i zastosowań medycznych

Podsumowując, celem nadrzędnym powyższych badań było wyselekcjonowanie takiego rodzaju AgNPs, którego trwałość i aktywność biologiczna pozwolą na prowadzenie szczegółowych badań prowadzących do wprowadzenia AgNPs na rynek jako potencjalnej alternatywy dla obecnie stosowanych substancji do leczenia owrzodzeń. Z 16 rodzajów przebadanych AgNPs tylko dwa rodzaje substancji spełniają kryteria. Są to AgNPs B12 i B14.

7. Spis tabel

Tabela 1. Szacunkowe rozmiary NPs odpowiadające poszczególnym długościom fali ²¹	10
Tabela 2. Zmiana absorbancji w czasie i długości fali odpowiadające maksimum absorbancji dla poszczególnych rodzajów AgNPs opłaszczanych PVP.	33
Tabela 3. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPs opłaszczanych PVP.....	33
Tabela 4. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi.	34
Tabela 5. Zmiana absorbancji w czasie dla poszczególnych rodzajów AgNPsC.	35
Tabela 6. Zmiana absorbancji w czasie dla poszczególnych rodzajów AgNPsB.	36
Tabela 7. Podsumowanie testów stabilności kinetycznej prowadzonych na AgNPsB.	37
Tabela 8. Porównanie średnich wartości MIC dla 6 szczepów gronkowca złocistego (Ś. MIC) wykonywane od razu po zakończeniu syntezy (0 tydz.), 2 i 4 tyg od zakończenia syntezy (2 tydz i 4 tydz.). Istotna statystycznie różnica w aktywności oznacza utratę aktywności przeciwgronkowcowej.....	39
Tabela 9. Porównanie średnich wartości MIC dla 6 szczepów gronkowca złocistego (Ś. MIC) wykonywane od razu po zakończeniu syntezy (0 tydz.), 12 i 24 tyg. od zakończenia syntezy (12 tydz i 24 tydz.). Istotna statystycznie różnica w aktywności oznacza utratę aktywności przeciwgronkowcowej.....	39
Tabela 10. Wartości MIC dla każdego rodzaju AgNPsPVP i dla poszczególnych szczepów <i>S. aureus</i> wykonywane w odstępach dwutygodniowych.	41
Tabela 11. Wartości MIC dla AgNPs C dla poszczególnych szczepów <i>S. aureus</i> wykonywane w odstępach dwutygodniowych.	42
Tabela 12. Wartości MIC dla AgNPs B i dla poszczególnych szczepów <i>S. aureus</i> wykonywane w odstępach dwutygodniowych.	43
Tabela 13. Różnice w wartościach MIC dla poszczególnych rodzajów AgNPs PVP w formie dializowanej i niedializowanej.....	46
Tabela 14. Różnice w wartościach MIC dla poszczególnych rodzajów AgNPs C w formie dializowanej i niedializowanej.....	47
Tabela 15. Oporność badanych szczepów <i>S. aureus</i> na konwencjonalne antybiotyki.	49

Tabela 16. Wyniki MIC dla AgNO ₃	49
Tabela 17. Krzywe spektroskopowe dla poszczególnych substancji chemicznych wykorzystanych jako czynniki opłaszczające oraz krzywe wykonane po zakończeniu syntezy AgNPs.....	62
Tabela 18. Wyniki analizy elementarnej dla AgNPsC.....	64
Tabela 19. Wyniki analizy elementarnej dla AgNPsB.....	64
Tabela 20. Wyniki obliczeń stosunków molowych składników AgNPsC.....	64
Tabela 21. Wyniki obliczeń stosunków molowych składników AgNPsB.....	64
Tabela 22. Modele AgNPs utworzone w oparciu o analizy fizykochemiczne.....	67

8. Spis rycin

Ryc. 1. Schemat powstawania NPs metali poprzez redukcję jonów srebra oraz proces agregacji NPs doprowadzający do powstania srebra koloidalnego.....	7
Ryc. 2. Działanie substancji opłaszczającej jako czynnika spowalniającego proces agregacji.....	8
Ryc. 3. Przykład procesu spalania analitycznego i przeprowadzenia analizy elementarnej. W wyniku procesu spalania otrzymuje się tlenki spalonych substancji, detektory gazowe wykrywają związki wodoru, węgla, azotu i fosforu. Po wykonaniu odpowiednich obliczeń chemicznych możliwe jest ustalenie wzoru sumarycznego badanego substratu. Srebro budujące AgNPs nie ulega spalaniu więc obliczając masę popiołu znana będzie liczba atomów srebra.	12
Ryc. 4. Płytką 96-dołkowa na której w poziomych rzędach od dołka 1 do 10 wykonano seryjne rozcieńczenia danego rodzaju NPs, dołek 11 stanowił kontrolę dodatnią, a dołek 12 kontrolę ujemną. Czarna strzałka wskazuje wartość MIC.	14
Ryc. 5. Na fotografii po lewej stronie znajduje się roztwór stabilizatora oraz azotanu srebra, zdjęcie po prawej stronie pokazuje moment tworzenia się AgNPs w trakcie dodawania substancji redukującej.....	28

9. Spis wykresów

Wykres 1. Krzywa absorpcji typowa dla NPs. Na przedstawionej krzywej największe stężenie badanej substancji odpowiada długości fali świetlnej charakterystycznej dla wielkości nano (ok. 400 nm). Pozostałe wzniesienia na krzywej odpowiadają obecności zanieczyszczeń roztworze.	11
Wykres 2. Krzywa transmitancji od liczby falowej dla cząsteczki kwasu karboksylowego C15.	23
Wykres 3. Krzywa transmitancji od liczby falowej dla cząsteczki kwasu karboksylowego pentadekanowego opłaszczającej AgNPs.	24
Wykres 4. Nałożone krzywe transmitancji od liczby falowej przedstawiające zmiany w budowie cząsteczki kwasu karboksylowego przed i po syntezie AgNPs. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że grupa funkcyjna kwasu karboksylowego pozostała, natomiast w łańcuchu karboksylowym pojawiło się wiązanie nienasycone. Poza tym kwasy karboksylowe nie tworzą polimerów.....	24
Wykres 5. Krzywe absorpcji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykonane po zakończeniu procesu syntezy.....	29
Wykres 6. Krzywe absorpcji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPs opłaszczanych kwasami karboksylowymi wykonane po zakończeniu procesu syntezy.....	30
Wykres 7. Wynik analizy DLS dla C15.....	30
Wykres 8. Krzywe absorpcji od długości fali dla poszczególnych rodzajów stabilnych kinetycznie AgNPs opłaszczanych estrami kwasu bursztynowego wykonane po zakończeniu procesu syntezy.....	31
Wykres 9. W formie wykresu przedstawiono zmianę absorpcji od czasu dla badanych roztworów AgNPsPVP.....	33
Wykres 10. Krzywe rozpadu wyrysowane na podstawie absorpcji mierzonej w czasie 20 dni. Przerywaną linią zaznaczono ekstrapolacje danych na dni w których pomiary nie były wykonywane.....	36
Wykres 11. Krzywe rozpadu wyznaczone na podstawie pomiarów absorpcji roztworów w czasie dla AgNPsB.	37
Wykres 12. Różnice w średnich wartościach MIC pomiędzy AgNPs oczyszczanymi i nieoczyszczanymi.	45

Wykres 13. Porównanie siły działania przeciwwgronkowcowego azotanu srebra i poszczególnych rodzajów nanocząstek wraz z uwzględnieniem istotnej statystycznie różnicy w sile działania zaznaczonej na kolor niebieski.	50
Wykres 14 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach <i>S. aureus</i> dla każdego rodzaju AgNPsPVP.....	51
Wykres 15 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach <i>S. aureus</i> dla każdego rodzaju AgNPsC.	52
Wykres 16 Wartości MIC mierzone na sześciu szczepach <i>S. aureus</i> dla każdego rodzaju AgNPsB.	53
Wykres 17. Porównanie siły działania przeciwwgronkowcowego grupy AgNPs PVP pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p>0.05$	54
Wykres 18. Porównanie siły działania przeciwwgronkowcowego grupy AgNPs C pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p>0.05$	56
Wykres 19. Porównanie siły działania przeciwwgronkowcowego grupy AgNPs B pomiędzy sobą i pozostałymi rodzajami AgNPs. Analiza statystyczna wykonana testem U-Manna Whitneya z istotnością na poziomie $p>0.05$	57
Wykres 20. Cytotoksyczność AgNPsB wobec linii komercyjnej ludzkich keratynocytów.....	68

10. Streszczenie

Nanocząstki srebra (AgNPs) są przedmiotem badań naukowców z wielu dziedzin dzięki swoim szczególnym właściwościom. Interdyscyplinarne badania z dziedziny dermatologii, mikrobiologii i chemii poczynione nad nanocząstkami srebra pozwoliły na wyjaśnienie wielu zagadnień dotychczas pomijanych lub analizowanych tylko pobieżnie.

Jednym z takich tematów jest trwałość nanocząstek. Większość nanocząstek srebra syntezowana na podstawie danych literaturowych okazywała się być trwała w czasie kilku godzin. Opracowano metodę syntezy nanocząstek srebra, których stabilność w roztworze pozwala na wykonanie dalszych badań mikrobiologicznych. Stabilność kinetyczną badano w czasie 14 dni. Co więcej po raz pierwszy wykonano testy oceniające utrzymywanie przez AgNPs działania przeciwgronkowcowego w czasie. Udowodniono, że w zależności od użytego stabilizatora (substancji opłaszczającej nanocząstkę) trwałość AgNPs wynosi od 4 tyg. do nawet 12 miesięcy.

Zagadnienie poruszane w literaturze chemicznej, a pomijane w prasie o tematyce medycznej to konieczność oczyszczania roztworu nanocząstek z zanieczyszczeń powstałych w procesie syntezy. Udowodniono, że dializa jest tania, prostą i łatwą do zastosowania na roztworach o dużych objętościach metodą oczyszczania substancji. Co więcej wykazano, że nanocząstki niepoddawane procesowi oczyszczania za pomocą dializy działają silniej wobec szczepów gronkowca złocistego, a co za tym idzie wyniki testów mikrobiologicznych ulegają zafałszowaniu poprzez stosowanie roztworów zanieczyszczonych, jak to ma miejsce w niektórych opublikowanych już wynikach badań.

Dobrze udowodniony jest wpływ kształtu i rozmiaru na działanie przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek srebra. Zastosowanie substancji opłaszczającej w danych literaturowych ogranicza się do funkcji chroniącej AgNPs przed agregacją. W badaniach własnych udowodniono, że rodzaj substancji opłaszczającej ma istotny wpływ na właściwości przeciwdrobnoustrojowe AgNPs. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego stabilizatora możliwe jest zwiększenie o kilkadziesiąt razy siły działania przeciwbakteryjnego. Niestety rodzaj stosowanego stabilizatora wpływa również na cytotoksyczność AgNPs.

Chociaż AgNPs są doskonałą alternatywą dla stosowanych antybiotyków i substancji odkażających, to wprowadzenie tych substancji do leczenia wymaga

przeprowadzenia szczegółowych badań długoterminowych w zakresie bezpieczeństwa stosowania, ale też trwałości i czystości stosowanych roztworów AgNPs.

11. Summary

Silver nanoparticles (AgNPs) are a subject of research by many scientists from different fields thanks to its special properties. Our own interdisciplinary research in the field of dermatology, microbiology and chemistry made over silver nanoparticles allowed to explain many issues that have been skipped or analysed so far scarcely.

The stability of nanoparticles is one of those topics. Most of the silver nanoparticles, synthesized based on literature data, turned out to be durable during a few hours. A method for the synthesis of more stable silver nanoparticles, than can survive further microbiological tests, has been developed. Kinetic stability was tested over 14 days. Moreover, tests assessing AgNPs maintenance of antimicrobial activity in time, were performed for the very first time. It has been proven that depending on the coating factor used (substance covering the nanoparticle) AgNPs stability ranges from 4 weeks to even 12 months.

The issue of purification the solution of nanoparticles from impurities formed in the synthesis process, has been discussed in the chemical literature, yet rarely in the medical. It has been proven that dialysis is a substance purification method that is cheap, simple and easy to apply when dealing with high volume solutions. Furthermore, it has been shown that nanoparticles that are not subjected to purification using dialysis have a stronger effect on *Staphylococcus aureus* strains, Therefore the results of microbiological tests can be falsified by the use of solutions that are polluted, as it has been already published in some already published research.

The influence of shape and size on antimicrobial properties silver nanoparticles is well-proven. The coating factor has an immense impact on the AgNPs protection function against aggregation. In our own research it has been proven that the type of coating substance has a significant effect on AgNPs antimicrobial properties too. Thanks to the application of a suitable stabilizer it is possible to increase the antibacterial potency by several dozen times. Unfortunately, the type of stabilizer used also affects the cytotoxicity of AgNPs.

AgNPs could be an alternative to widely used antibiotics and disinfectants. Nevertheless, the introduction of those substances to health care requires a detailed long-term research not only in the field of safety use, yet also durability and purity of AgNPs solutions used.

12. Piśmiennictwo

1. Tillotson G. A crucial list of pathogens. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):234-236. doi:10.1016/S1473-3099(17)30754-5
2. Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M. *DERMATOLOGIA Braun-Falco*. 2nd ed. (Gliński W, Czarnecka-Operacz M, Krasowska D, Serwin AB, Wolska H, eds.). Lublin: Czelej; 2011.
3. Peiris MK, Gunasekara CP, Jayaweera PM, Arachchi ND, Fernando N. Biosynthesized silver nanoparticles: are they effective antimicrobials? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(8):537-543. doi:10.1590/0074-02760170023
4. Ansari M, Khan H, Khan A, Cameotra S, Alzohairy M. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33(1):101. doi:10.4103/0255-0857.148402
5. Shanmugasundaram T, Radhakrishnan M, Gopikrishnan V, Kadirvelu K, Balagurunathan R. Biocompatible silver, gold and silver/gold alloy nanoparticles for enhanced cancer therapy: in vitro and in vivo perspectives. *Nanoscale*. 2017. doi:10.1039/C7NR04979J
6. Chen S, Liu B, Carlson MA, Gombart AF, Reilly DA, Xie J. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine*. 2017;12(11):1335-1352. doi:10.2217/nmm-2017-0017
7. Kalashnikova I, Das S, Seal S. Nanomaterials for wound healing: scope and advancement. *Nanomedicine*. 2015;10(16):2593-2612. doi:10.2217/nmm.15.82
8. Sawosz F, Pineda L, Hotowy A, et al. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of silver nanoparticles and ATP on expression of chosen genes involved in myogenesis. *Arch Anim Nutr*. 2013;67(5):347-355. doi:10.1080/1745039X.2013.830520
9. Hong X, Wen J, Xiong X, Hu Y. Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(5):4489-4497. doi:10.1007/s11356-015-5668-z
10. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, et al. Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. Quigg A, ed. *PLoS One*. 2014;9(7):e102108. doi:10.1371/journal.pone.0102108

11. Gaffet, Eric. (2011). Nanomaterials : a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development Nanomatériaux : une revue des définitions, des applications, des effets sanitaires et des moyens à mettre en oeuvre pour un.
12. Evanoff DD, Chumanov G. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem*. 2005;6(7):1221-1231. doi:10.1002/cphc.200500113
13. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J Phys Chem B*. 2003;107(3):668-677. doi:10.1021/jp026731y
14. . W. Kelsall, I. W. Hamley, M. Geoghegan; Nanotechnologia; Warszawa; PWN, 2008.
15. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004;275(1):177-182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012
16. Kang J, Dietz MJ, Hughes K, Xing M, Li B. Silver nanoparticles present high intracellular and extracellular killing against Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother*. February 2019. doi:10.1093/jac/dkz053
17. Labille J, Brant J. Stability of nanoparticles in water. *Nanomedicine*. 2010;5(6):985-998. doi:10.2217/nmm.10.62
18. Kittler S, Greulich C, Köller M, Epple M. Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells. *Materwiss Werksttech*. 2009;40(4):258-264. doi:10.1002/mawe.200800437
19. Malina D, Sobczak-kupiec A, Wzorek Z, Kowalski Z. Silver nanoparticles synthesis with different concentrations of Polyvinylpyrrolidone. *Dig J Nanomaterials Biostructures*. 2012;7(4):1527-1534.
20. Iwalokun BA, Akinloye O, Udoh BE, Akinyemi KO. Efficacy of silver nanoparticles against multidrug resistant clinical Staphylococcus aureus isolates from Nigeria. *J Immunoass Immunochem*. January 2019:1-23. doi:10.1080/15321819.2018.1555765
21. Haber J, Sokolov K. Synthesis of Stable Citrate-Capped Silver Nanoprisms. *Langmuir*. 2017;33(40):10525-10530. doi:10.1021/acs.langmuir.7b01362
22. Andrzej Cygański. *Metody Spektroskopowe w Chemii Analitycznej*. PWN; 2018.
23. Roman Mazurkiewicz. *Metody Spektroskopowe i Ich Zastosowanie Do*

- Identyfikacji Związków Organicznych.* (Zieliński W, Rajca A, eds.). Warszawa: WNT; 2000.
24. Mulfingher L, Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam A V., Rutkowsky SA, Boritz C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J Chem Educ.* 2007;84(2):322. doi:10.1021/ed084p322
 25. Holmes F. Elementary Analysis and the Origins of Physiological Chemistry. *Univ Chicago Press Hist Sci Soc.* 1963;54(1):50-81. doi:10.2307/228728
 26. No Title.
http://www.korld.edu.pl/pdf/eucast/EUCAST_breakpoints_tlumaczenie_v2-2012.pdf.
 27. Weinstein M. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition.*; 2018.
 28. Chen S, Ge L, Gombart AF, et al. Nanofiber-based sutures induce endogenous antimicrobial peptide. *Nanomedicine.* 2017;12(21):2597-2609. doi:10.2217/nmm-2017-0161
 29. Hebeish A, El-Rafie MH, EL-Sheikh MA, Seleem AA, El-Naggar ME. Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2014;65:509-515. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.01.071
 30. Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. *Res Microbiol.* 2011;162(5):542-549. doi:10.1016/j.resmic.2011.04.009
 31. Gao M, Sun L, Wang Z, Zhao Y. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(1):397-404. doi:10.1016/j.msec.2012.09.005
 32. Kumar V, Wadhwa R, Kumar N, Maurya PK. A comparative study of chemically synthesized and Camellia sinensis leaf extract-mediated silver nanoparticles. *3 Biotech.* 2019;9(1):0. doi:10.1007/s13205-018-1544-0
 33. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346-2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059
 34. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(6):1465-1471. doi:10.1007/s10856-013-4894-5

35. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(6):1712-1720. doi:10.1128/AEM.02218-06
36. Kuo Y-L, Wang S-G, Wu C-Y, et al. Functional gold nanoparticle-based antibacterial agents for nosocomial and antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine*. 2016;11(19):2497-2510. doi:10.2217/nnm-2016-0232
37. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 2012;28(2):1095-1104. doi:10.1021/la202328n
38. Ahamed M, Alsalhi MS, Siddiqui MKJ. Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1841-1848. doi:10.1016/j.cca.2010.08.016
39. Schneider M, Stracke F, Hansen S, Schaefer UF. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinol*. 2009;1(4):197-206. doi:10.4161/derm.1.4.9501
40. Bianco C, Adami G, Crosera M, et al. Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: a comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications. *Burns*. 2014;40(7):1390-1396. doi:10.1016/j.burns.2014.02.003
41. Tak YK, Pal S, Naoghare PK, Rangasamy S, Song JM. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci Rep*. 2015;5:16908. doi:10.1038/srep16908
42. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. February 2019:1. doi:10.1038/s41579-018-0147-4
43. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol*. 2017;18(1):130. doi:10.1186/s13059-017-1252-9
44. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchDrugDetails>. Accessed May 15, 2016.
45. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Daptomycin activity tested against 164457 bacterial isolates from hospitalised patients: Summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005–2012). *Int J Antimicrob Agents*.

- 2014;43(5):465-469. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.01.018
46. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J*. 2006;3(3):225-231. doi:10.1111/j.1742-481X.2006.00159.x
 47. Lin YT, Shau WY, Wang LF, et al. Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy*. 2000;55(7):641-646.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10921463>.
 48. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis*. 2008;197(9):1226-1234. doi:10.1086/533494
 49. Bektas S, Obradovic A, Aljicevic M, Numanovic F, Hodzic D, Sporisevic L. The Frequency of Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (CA-MRSA) Among Samples in Institute for Public Health in Canton Sarajevo. *Mater Socio Medica*. 2016;28(1):61. doi:10.5455/msm.2016.28.61-65
 50. Saeb ATM, Alshammari AS, Al-Brahim H, Al-Rubeaan KA. Production of Silver Nanoparticles with Strong and Stable Antimicrobial Activity against Highly Pathogenic and Multidrug Resistant Bacteria. *Sci World J*. 2014;2014:1-9. doi:10.1155/2014/704708
 51. Le A, Thi L, Dinh P, Huy PT, Quang T, Hieu N Van. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(6):910-916. doi:10.1016/j.msec.2010.04.009
 52. Im AR, Kim JY, Kim HS, Cho S, Park Y, Kim YS. Wound healing and antibacterial activities of chondroitin sulfate- and acharan sulfate-reduced silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2013;24(39). doi:10.1088/0957-4484/24/39/395102
 53. Zarrintaj P, Moghaddam AS, Manouchehri S, et al. Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine*. 2017;12(19):2403-2422. doi:10.2217/nnm-2017-0173
 54. Kamoun EA, Kenawy E-RS, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res*. 2017;8(3):217-233. doi:10.1016/j.jare.2017.01.005
 55. Sevgi M, Toklu A, Vecchio D, Hamblin M. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2014;8(3):161-197.

doi:10.2174/1574891X08666131112143447

56. Mehrholz D, Domagała P, Zielińska E, Barańska-Rybak W. Innovative methods of biofilm treatment in chronic wounds. 2016;(4):295-302.
doi:10.5114/dr.2016.61779
57. Tian J, Wong KKY, Ho C-M, et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem*. 2007;2(1):129-136.
doi:10.1002/cmdc.200600171
58. Patakfalvi R, Dékány I. NUCLEATION AND GROWTH OF SILVER NANOPARTICLES MONITORED BY TITRATION MICROCALORIMETRY. *J of Thermal Anal Calorim*. 2005;79:587-594.
59. Ortiz C, Torres R, Paredes D. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1717. doi:10.2147/IJN.S57156
60. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 2010;26(22):16690-16698.
doi:10.1021/la101768n
61. Ankamwar B, Damle C, Ahmad A, Sastry M. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Emblica Officinalis fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005;5(10):1665-1671. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16245525>.
62. Das A, Kumar A, Patil NB, Viswanathan C, Ghosh D. Preparation and characterization of silver nanoparticle loaded amorphous hydrogel of carboxymethylcellulose for infected wounds. *Carbohydr Polym*. 2015;130:254-261. doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.082
63. Bagheri H, Banihashemi S. Sol-gel-based silver nanoparticles-doped silica – Polydiphenylamine nanocomposite for micro-solid-phase extraction. *Anal Chim Acta*. 2015;886:56-65. doi:10.1016/j.aca.2015.06.012
64. Esmacillou M, Zarrini G, Ahangarzadeh Rezaee M, Shahbazi Mojarrad J, Bahadori A. Vancomycin Capped with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Adv Pharm Bull*. 2017;7(3):479-483. doi:10.15171/apb.2017.058
65. Pérez-Díaz MA, Boegli L, James G, et al. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against Streptococcus mutans and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng*

- C. 2015;55(55):360-366. doi:10.1016/j.msec.2015.05.036
66. Jang H, Lim SH, Choi JS, Park Y. Antibacterial properties of cetyltrimethylammonium bromide-stabilized green silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Pharm Res*. 2015;38(10):1906-1912. doi:10.1007/s12272-015-0605-8
67. He XC, Lin M, Li F, et al. Advances in studies of nanoparticle–biomembrane interactions. *Nanomedicine*. 2015;10(1):121-141. doi:10.2217/nmm.14.167
68. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2009;5(4):452-456. doi:10.1016/j.nano.2009.01.012

